

Université de Montréal

**Base moléculaire et rôle du courant potassique transitoire ( $I_A$ )  
des interneurons de l'hippocampe chez le rongeur.**

par  
Mathieu Bourdeau

Département de physiologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor*  
en sciences neurologiques

Mai, 2010

© Mathieu Bourdeau, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Base moléculaire et rôle du courant potassique transitoire ( $I_A$ )  
des interneurons de l'hippocampe chez le rongeur.**

présentée par :  
Mathieu Bourdeau

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Vincent Castellucci,  
président-rapporteur

M. Jean-Claude Lacaille,  
directeur de recherche

M. Réjean Dubuc,  
membre du jury

M. Sylvain Williams,  
examineur externe

M. John Kalaska,  
représentant du doyen de la FESP

## RESUME

---

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la mémoire et l'apprentissage chez les mammifères sont incomplètement compris. Le rythme thêta de l'hippocampe constitue l'état « en ligne » de cette structure qui est cruciale pour la mémoire déclarative. Dans la région CA1 de l'hippocampe, les interneurons inhibiteurs LM/RAD démontrent des oscillations de potentiel membranaire (OPM) intrinsèques qui pourraient se révéler importantes pour la génération du rythme thêta. Des travaux préliminaires ont suggéré que le courant  $K^+ I_A$  pourrait être impliqué dans la génération de ces oscillations. Néanmoins, peu de choses sont connues au sujet de l'identité des sous-unités protéiques principales et auxiliaires qui soutiennent le courant  $I_A$  ainsi que l'ampleur de la contribution fonctionnelle de ce courant  $K^+$  dans les interneurons.

Ainsi, cette thèse de doctorat démontre que le courant  $I_A$  soutient la génération des OPM dans les interneurons LM/RAD et que des protéines Kv4.3 forment des canaux qui contribuent à ce courant. De plus, elle approfondit les connaissances sur les mécanismes qui régissent les interactions entre les sous-unités principales de canaux Kv4.3 et les protéines accessoires KChIP1. Finalement, elle révèle que la protéine KChIP1 module le courant  $I_A$ -Kv4.3 natif et la fréquence de décharge des potentiels d'action dans les interneurons.

Nos travaux contribuent à l'avancement des connaissances dans le domaine de la modulation de l'excitabilité des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe et permettent ainsi de mieux saisir les mécanismes qui soutiennent la fonction de l'hippocampe et possiblement la mémoire chez les mammifères.

**MOTS-CLÉS EN FRANÇAIS :** hippocampe, rythme thêta, interneurons, excitabilité, oscillations de potentiel membranaire, courant  $I_A$ , Kv4.3, KChIP1.

## ABSTRACT

---

Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory in mammals are incompletely understood. The theta rhythm in the hippocampus constitutes the « on-line » state of this structure which is crucial for declarative memory. In the CA1 hippocampal area, LM/RAD inhibitory interneurons exhibit intrinsic membrane potential oscillations (MPOs) that could be important for the generation of theta rhythm. Preliminary work suggested that  $K^+$  current  $I_A$  could be involved in the generation of these oscillations. Nevertheless, little is known about the identity of the principal and auxiliary protein subunits underlying  $I_A$  current and the extent of the functional contribution of this  $K^+$  current in hippocampal interneurons.

Thus, this Ph.D. thesis shows that  $I_A$  current underlies MPO generation in LM/RAD interneurons and that Kv4.3 proteins form channels that contribute to this current. Also, it deepens the knowledge on the mechanism controlling the interactions between Kv4.3 channel-forming principal subunits and KChIP1 auxiliary proteins. Finally, it reveals that KChIP1 modulates native  $I_A$ -Kv4.3 current and the action potential discharge frequency in interneurons.

Our work takes part in advancing the knowledge on the field of modulation of excitability in hippocampal inhibitory interneurons and allows a better understanding of the mechanisms underlying the function of the hippocampus and possibly memory in mammals.

**ENGLISH KEY WORDS :** hippocampus, theta rhythm, interneurons, excitability, membrane potential oscillations,  $I_A$  current, Kv4.3, KChIP1.

## REMERCIEMENTS

---

Pour débiter, j'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse, Messieurs Vincent Castellucci, Réjean Dubuc et John Kalaska, de l'Université de Montréal ainsi que M. Sylvain Williams, de l'Université McGill pour avoir accepté de lire et d'examiner cette thèse.

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de recherche, M. Jean-Claude Lacaille, de l'Université de Montréal. Premièrement, pour m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre mes études graduées dans son laboratoire, puis, pour la qualité du support et de la formation que j'ai pu recevoir lors de mon cheminement dans son laboratoire. Merci aussi à Messieurs Vincent Castellucci et Louis-Éric Trudeau pour leur contribution à mon comité de parrainage du programme d'études en sciences neurologiques.

Un merci particulier à France Morin pour son aide considérable et sa patience qui ont été grandement appréciées. Merci aussi à Julie Pepin, Catherine Bourgeois et Vicky Arsenault pour leur support technique et à Mounia Azzi, Charles Laurent, Alfredo Mendez et Isabel Laplante avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Je désire remercier tous les collègues du laboratoire Lacaille et du Département de physiologie que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours des années, en particulier mes joyeux partenaires de bureau et de pauses-café : Alex, Delphine, Julie, Thomas, Charles, Fred, Catherine, Claude et Aude.

Un grand merci à Geneviève, à mes parents, à Nicolas, aux membres de ma famille et à mes amis pour leur support inconditionnel.

Finalement, j'aimerais remercier le Groupe de recherche sur le système nerveux central (GRSNC) et la Faculté des études supérieures et postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal, de même que le laboratoire du Dr. Jean-Claude Lacaille pour leur soutien financier.

## TABLE DES MATIERES

---

<b>RESUME.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS.....</b>	<b>XII</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 IMPLICATION DU LOBE TEMPORAL DANS L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMOIRE .....</b>	<b>2</b>
<i>1.1.1 CONTRIBUTION DU LOBE TEMPORAL À LA MÉMOIRE HUMAINE .....</i>	<i>2</i>
<i>1.1.2 MÉMOIRES DÉCLARATIVE ET NON DÉCLARATIVE.....</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3 IMPORTANCE DE L'HIPPOCAMPE POUR LA MÉMOIRE À LONG TERME .....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.4 STOCKAGE À LONG TERME DES INFORMATIONS DANS LE NÉOCORTEX .....</i>	<i>6</i>
<b>1.2. ORGANISATION DE LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE.....</b>	<b>6</b>
<i>1.2.1 COMPLEXE SUBICULAIRE ET CORTEX ENTORHINAL.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2 GYRUS DENTELÉ .....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3 L'HIPPOCAMPE .....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3.1 Organisation laminaire.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2.3.2 Cellules pyramidales et transfert d'information.....</i>	<i>10</i>
<i>1.2.3.3 Diversité des interneurons du réseau inhibiteur hippocampique .....</i>	<i>11</i>
<i>1.2.3.4 Modes d'inhibition des cellules pyramidales par les interneurons.....</i>	<i>16</i>
<b>1.3. TRAITEMENT DE L'INFORMATION DANS L'HIPPOCAMPE.....</b>	<b>17</b>
<i>1.3.1 TRANSMISSION ET PLASTICITÉ SYNAPTIQUE DANS L'HIPPOCAMPE.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3.1.1 Transmission synaptique.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3.1.2 Plasticité synaptique .....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.2 PATRONS ÉLECTRÉNCÉPHALOGRAPHIQUES HIPPOCAMPIQUES.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.2.1 Patrons EEG hippocampiques non rythmiques .....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.2.2 Patrons EEG hippocampiques rythmiques .....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.3 OSCILLATIONS THÊTA : ÉTAT « EN LIGNE » DE L'HIPPOCAMPE .....</i>	<i>26</i>
<b>1.4. GENERATION DU RYTHME THETA DANS L'HIPPOCAMPE .....</b>	<b>28</b>
<i>1.4.1 MODÈLE CLASSIQUE .....</i>	<i>28</i>
<i>1.4.2 AUTRES CONTRIBUTIONS À LA GÉNÉRATION DU RYTHME THÊTA.....</i>	<i>30</i>
<b>1.5. INTERNEURONES ET ACTIVITE RYTHMIQUE INTRINSEQUE .....</b>	<b>32</b>
<i>1.5.1 ACTIVITÉ OSCILLATOIRE INTRINSÈQUE DANS LES INTERNEURONES LM/RAD .....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.1.1 Caractéristiques des OPM des interneurons LM/RAD .....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.1.2 OPM des interneurons et génération du rythme thêta .....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.2 MÉCANISMES IONIQUES DE GÉNÉRATION DES OPM .....</i>	<i>35</i>

1.5.2.1 OPM dans les interneurones et courants $\text{Ca}^{2+}$ , $I_h$ et $\text{Na}^+$ .....	36
1.5.2.2 OPM dans les interneurones et courants $\text{K}^+$ .....	36
1.5.2.3 Relations avec d'autres mécanismes de génération d'activité rythmique .....	36
<b>1.6. CANAUX IONIQUES</b> .....	37
1.6.1 CLASSES DE CANAUX IONIQUES .....	37
<b>1.7. COURANT <math>I_A</math> : PROPRIETES, ROLES ET BASES MOLECULAIRES</b> .....	42
1.7.1 PROPRIÉTÉS ET RÔLES CONNUS DU COURANT $I_A$ .....	42
1.7.1.1 Propriétés du courant $I_A$ .....	42
1.7.1.2 Courant $I_A$ et potentiels d'action .....	43
1.7.1.3 Contribution du courant $I_A$ à l'intégration de l'information .....	43
1.7.2 BASES MOLÉCULAIRES DU COURANT $I_A$ SOMATODENDRITIQUE .....	44
1.7.2.1 Les canaux $\text{Kv4}$ comme candidats potentiels .....	44
1.7.2.2 Propriétés des canaux $\text{Kv4}$ et distribution dans l'hippocampe .....	45
1.7.2.3 Protéines accessoires aux canaux $\text{Kv4}$ .....	48
<b>CHAPITRE II. BUT DE LA THÈSE</b> .....	<b>52</b>
2.1 PROBLÉMATIQUE .....	52
2.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES .....	53
<b>CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b> ...	<b>55</b>
3.1 PRÉAMBULE .....	55
3.2 ABSTRACT .....	55
3.3 INTRODUCTION .....	55
<b>3.4 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>57</b>
3.4.1 HIPPOCAMPAL SLICE PREPARATION AND CULTURE .....	57
3.4.2 ELECTROPHYSIOLOGY .....	58
3.4.3 HEK293 CELLS .....	59
3.4.4 CONSTRUCTS, siRNAs AND TRANSFECTIONS .....	60
3.4.5 IMMUNOCYTOCHEMISTRY .....	60
3.4.6 STATISTICAL ANALYSIS .....	62
<b>3.5 RESULTS</b> .....	<b>62</b>
3.5.1 MPOS IN LM/R INTERNEURONS DEPEND ON $\text{Na}^+$ AND $\text{K}^+$ CURRENTS .....	62
3.5.2 PROPERTIES OF A-TYPE $\text{K}^+$ CURRENTS AND EXPRESSION OF $\text{Kv4.3}$ IN LM/R INTERNEURONS .....	63
3.5.3 $\text{Kv4.3}$ -MEDIATED A-TYPE $\text{K}^+$ CURRENTS AND FUNCTIONAL KNOCKDOWN IN RECOMBINANT SYSTEM .....	65
3.5.4 $\text{Kv4.3}$ siRNA SELECTIVELY REDUCES A-TYPE $\text{K}^+$ CURRENTS IN LM/R INTERNEURONS .....	66
3.5.5 $\text{Kv4.3}$ siRNA IMPAIRS MPOS IN LM/R INTERNEURONS .....	68
3.5.6 SPECIFIC INTERNEURON SUBPOPULATIONS EXPRESSING $\text{Kv4.3}$ .....	69
<b>3.6 DISCUSSION</b> .....	<b>70</b>
<b>3.7 REFERENCES</b> .....	<b>74</b>
<b>3.8 ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	<b>78</b>
<b>3.9 TABLES, FIGURES AND LEGENDS</b> .....	<b>78</b>
<b>CHAPITRE IV. SECONDE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b> .....	<b>92</b>
4.1 PREAMBULE .....	92

<b>4.2 ABSTRACT .....</b>	<b>92</b>
<b>4.3 INTRODUCTION.....</b>	<b>93</b>
<b>4.4 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>95</b>
4.4.1 ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE AND HEK293 CELL CULTURES .....	95
4.4.2 CONSTRUCTS, siRNAs AND TRANSFECTIONS .....	95
4.4.3 ELECTROPHYSIOLOGY.....	96
4.4.4 IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND IMAGE ANALYSIS .....	98
4.4.5 WESTERN BLOTTING .....	99
4.4.6 STATISTICAL ANALYSIS.....	100
<b>4.5 RESULTS .....</b>	<b>100</b>
4.5.1 KChIP1 EXPRESSION IN LM/RAD INTERNEURONS .....	100
4.5.2 RECOMBINANT Kv4.3 MODULATION BY $\beta$ -SUBUNIT KChIP1 .....	100
4.5.3 siRNA-MEDIATED SPECIFIC KNOCKDOWN OF KChIP1 EXPRESSION IN SLICE CULTURES .....	103
4.5.4 KChIP1 KNOCKDOWN SLOWS A-TYPE $K^+$ CURRENT RECOVERY FROM INACTIVATION SELECTIVELY IN INTERNEURONS .....	103
4.5.5 KChIP1 siRNA ACCELERATES REPETITIVE FIRING SELECTIVELY IN INTERNEURONS .....	105
<b>4.6 DISCUSSION .....</b>	<b>107</b>
4.6.1 RECOMBINANT Kv4.3/KChIP1 INTERACTIONS .....	107
4.6.2 KChIP1 MODULATION OF INTERNEURON A-TYPE $K^+$ CURRENTS .....	108
4.6.3 KChIP1 MODULATION OF INTERNEURON EXCITABILITY .....	110
<b>4.7 REFERENCES.....</b>	<b>111</b>
<b>4.8 ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>115</b>
<b>4.9 TABLES, FIGURES AND LEGENDS .....</b>	<b>115</b>
<b>CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>132</b>
<b>5.1 RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE .....</b>	<b>132</b>
<b>5.2 IDENTITE DES CANAUX A LA BASE DU COURANT <math>I_A</math> DANS LES INTERNEURONES 133</b>	
5.2.1 DES CANAUX Kv4.3 HOMOMÉRIQUES DANS LES INTERNEURONES LM/RAD ? .....	133
5.2.2 DISTRIBUTION ET TRAFIC DES CANAUX Kv4.3 DANS LES INTERNEURONES.....	135
5.2.3 RÉGULATION DÉVELOPPMENTALE DES CANAUX $I_A$ .....	136
<b>5.3 BASE IONIQUE ET IMPORTANCE DES OPM DANS LES INTERNEURONES LM/RAD 137</b>	
5.3.1 MÉCANISME IONIQUE DE GÉNÉRATION DES OPM DANS LES INTERNEURONES.....	137
5.3.1.1 Contrôle des OPM par la modulation du courant $I_A$ .....	139
5.3.1.2 Base moléculaire des courants $Na^+$ impliqués dans les OPM.....	140
5.3.2 OPM DANS LES INTERNEURONES LM/RAD ET RYTHME THETA HIPPOCAMPIQUE .....	141
5.3.2.1 Modèle intégré de génération du rythme $\theta$ : contributions extrinsèques.....	141
5.3.2.2 Modèle intégré de génération du rythme $\theta$ : contributions intrinsèques .....	142
<b>5.4 COMPLEXE MACROMOLECULAIRE Kv4 DANS LES INTERNEURONES .....</b>	<b>146</b>
5.4.1 RÉCUPÉRATION DE L'INACTIVATION DU COURANT $I_A$ DANS LES INTERNEURONES .....	146
5.4.1.1 Importance de la protéine accessoire KChIP1 .....	147
5.4.1.2 Mécanisme d'interaction Kv4.3/KChIP1 .....	148
5.4.2 PARTENAIRES ADDITIONNELS DU COMPLEXE Kv4 DANS LES INTERNEURONES.....	149
5.4.2.1 Un complexe Kv4.3/KChIP1/DPPL dans les interneurones ? .....	150
5.4.2.2 Modèle de la modulation du courant $I_A$ et de la fonction des interneurones par KChIP1.....	151
5.4.3.2 Protéines accessoires du complexe Kv4 : autres avenues de recherche.....	154
<b>5.5 CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>156</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE .....</b>	<b>157</b>



## **LISTE DES FIGURES**

---

### **CHAPITRE I. INTRODUCTION**

FIGURE 1. SYSTEMES DE MEMOIRE A LONG TERME CHEZ LES MAMMIFERES.....	4
FIGURE 2. ORGANISATION GENERALE DE LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE.....	7
FIGURE 3. DIVERSITE DES INTERNEURONES DE LA REGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE.....	12
FIGURE 4. DIFFERENTS MODES D'INHIBITION.....	17
FIGURE 5. PHASE PRECOCE DE LA PLT ASSOCIATIVE HIPPOCAMPIQUE .....	21
FIGURE 6. ACTIVITE IRRÉGULIERE DE LARGE AMPLITUDE (ILA) .....	24
FIGURE 7. RYTHME THETA HIPPOCAMPIQUE .....	25
FIGURE 7. MODELE « CLASSIQUE » DE GENERATION DU RYTHME THETA DANS LA REGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE .....	30
FIGURE 8. INTERNEURONES LM/RAD ET ACTIVITE THETA.....	35
FIGURE 9. EXEMPLES DE MEMBRES DES TROIS GRANDES CLASSES DE CANAUX IONIQUES..	39
FIGURE 10. LA SUPERFAMILLE DES CANAUX IONIQUES DEPENDANTS DU VOLTAGE .....	41
FIGURE 11. INTERACTIONS Kv4/KCHIP .....	50

### **CHAPITRE III. PREMIERE SECTION DE RESULTATS EXPERIMENTAUX**

FIGURE 1. MEMBRANE POTENTIAL OSCILLATIONS (MPOS) IN LM/R INTERNEURONS IN ACUTE SLICES ARE DEPENDENT ON 4-AP-SENSITIVE $K^+$ CURRENTS BUT NOT ON $I_H$ OR $I_M$ .....	79
FIGURE 2. PROPERTIES OF A-TYPE $K^+$ CURRENTS AND EXPRESSION OF Kv4.3 IN LM/R INTERNEURONS IN ACUTE SLICES.....	81
FIGURE 3. Kv4.3-MEDIATED A-TYPE $K^+$ CURRENTS AND FUNCTIONAL KNOCKDOWN BY siRNA IN HEK293 CELLS.....	83
FIGURE 4. Kv4.3 siRNA REDUCES A-TYPE $K^+$ CURRENTS IN INTERNEURONS IN SLICE CULTURES .....	85
FIGURE 5. Kv4.3 siRNA DID NOT AFFECT A-TYPE $K^+$ CURRENTS IN CA1 PYRAMIDAL CELLS IN SLICE CULTURES.....	87
FIGURE 6. Kv4.3 siRNA BROADENS ACTION POTENTIALS AND INHIBITS MPOS IN INTERNEURONS IN SLICE CULTURES.....	88
FIGURE 7. SPECIFIC SUBPOPULATIONS OF CA1 INTERNEURONS COEXPRESSING Kv4.3 AND $Ca^{2+}$ -BINDING PROTEINS OR PEPTIDES .....	90

### **CHAPITRE IV. SECONDE SECTION DE RESULTATS EXPERIMENTAUX**

FIGURE 1. EXPRESSION OF KCHIP1 IN LM/RAD INTERNEURONS IN HIPPOCAMPAL SLICE CULTURES .....	115
FIGURE 2. MODULATION OF Kv4.3 $I_{DENSITY}$ AND MEMBRANE LOCALIZATION BY KCHIP1 IN HEK293 CELLS .....	116
FIGURE 3. KCHIP1 MODULATION OF Kv4.3 CURRENT PROPERTIES IN HEK293 CELLS....	118
FIGURE 4. N-TERMINAL REGION OF Kv4.3 IS CRITICAL FOR FUNCTIONAL INTERACTION WITH KCHIP1 IN HEK293 CELLS.....	120

FIGURE 5. EFFICIENT AND SELECTIVE KNOCKDOWN OF KCHIP1 EXPRESSION IN SLICE CULTURES BY siRNA .....	122
FIGURE 6. siRNA-KCHIP1 SLOWS A-TYPE $K^+$ CURRENT RECOVERY FROM INACTIVATION IN LM/RAD INTERNEURONS .....	123
FIGURE 7. siRNA-KCHIP1 ACCELERATES REPETITIVE FIRING IN INTERNEURONS .....	125
FIGURE S1. siRNA-KCHIP1 DOES NOT AFFECT A-TYPE $K^+$ CURRENTS IN CA1 PYRAMIDAL CELLS IN SLICE CULTURES .....	129
FIGURE S2. siRNA-KCHIP1 DOES NOT AFFECT SUBTHRESHOLD MEMBRANE POTENTIAL OSCILLATIONS IN CA1 INTERNEURONS .....	131

## CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE

FIGURE 12. MODÈLE INTÉGRÉ DE GÉNÉRATION DU RYTHME THÊTA DANS LA RÉGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE .....	145
FIGURE 13. MODULATION DU COURANT $I_A$ -Kv4.3 ET DE LA DÉCHARGE DANS LES INTERNEURONES LM/RAD PAR KCHIP1 .....	153

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

### **CHAPITRE III. PREMIERE SECTION DE RESULTATS EXPERIMENTAUX**

TABLE 1. COEXPRESSION OF $\text{Ca}^{2+}$ -BINDING PROTEINS AND PEPTIDES WITH Kv4.3 IN CA1 INTERNEURONS .....	78
SUPPLEMENTAL TABLE 1. PROPERTIES OF CA1 NEURONS WITH WHOLE-CELL RECORDINGS IN HIPPOCAMPAL ACUTE AND CULTURED SLICES .....	91

### **CHAPITRE IV. SECONDE SECTION DE RESULTATS EXPERIMENTAUX**

SUPPLEMENTAL TABLE 1. A-TYPE $\text{K}^{+}$ CURRENT PROPERTIES IN UNTRANSFECTED LM/RAD INTERNEURONS IN SLICE CULTURES.....	127
SUPPLEMENTAL TABLE 2. SIMILAR ACTION POTENTIAL WAVEFORM AND BROADENING IN TRANSFECTED INTERNEURONS IN SLICE CULTURES .....	128

## **LISTE DES ABBREVIATIONS**

---

4-AP : 4-aminopyridine

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

ACh : acétylcholine

ACSF : « *artificial cerebrospinal fluid* »

AHP : « *afterhyperpolarization* »

ARNi : ARN interférent

ILA : activité irrégulière à large amplitude

IPA : activité irrégulière à petite amplitude

AMPA :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate

CCK : cholécystokinine (« *cholecystokinin* »)

CPSI : courant postsynaptique inhibiteur

DLT : dépression à long terme

DMEM : « *Dulbelcco's modified Eagle's medium* »

DPPL : similaire à la dipeptidyl aminopeptidase (« *dipeptidyl aminopeptidase-like* »)

EEG : électroencéphalographie

EEGi : électroencéphalographie intracrânienne

EYFP : « *enhanced yellow fluorescent protein* »

GABA : acide gamma-aminobutyrique

GFP : « *green fluorescent protein* »

HEK293 : « *human embryonic kidney 293* »

$I_A$  : courant  $K^+$  de type A (« *A-type  $K^+$  current* »)

$I_D$  : courant  $K^+$  sensible à la dendrotoxine (« *dendrotoxine-sensitive  $K^+$  current* »)

$I_{\text{density}}$  : « *current density* »

$I_h$  : courant cationique activé par l'hyperpolarisation (« *hyperpolarization-activated cationic current* »)

$I_{KCa}$  : courant  $K^+$  dépendant du  $Ca^{2+}$  («  *$Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  current* »)

$I_M$  : courant  $K^+$  sensible à la muscarine (« *muscarine-sensitive  $K^+$  current* »)

$I_{NaP}$  : courant  $Na^+$  persistant

$I_{to}$  : courant transitoire sortant (« *transient outward current* »)

IPI : « *interpulse interval* »  
ISI : intervalle de temps entre les potentiels d'action (« *interspike interval* »)  
KChIP : protéine interagissant avec les canaux Kv (« *Kv channel interacting protein* »)  
LM/RAD : *strata lacunosum-moleculare* et *radiatum*  
LTP : « *long-term potentiation* »  
mACh : récepteur cholinergique muscarinique  
MPOs : « *membrane potentiel oscillations* »  
NCS : senseur neuronal de calcium (« *neuronal calcium sensor* »)  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
NPY : neuropeptide Y  
OPM : oscillations de potentiel membranaire  
PKC : protéine kinase C  
PLT : potentialisation à long terme  
PPSE : potentiel postsynaptique excitateur  
PPSI : potentiel postsynaptique inhibiteur  
PV : parvalbumine  
siRNA : « *small interfering RNA* »  
SM-BDB : septum médian - bande diagonale de Broca  
SNC : système nerveux central  
TBS : « *tris buffer saline* »  
TEA : tetraethylammonium  
TTX : tetrodotoxine  
VGLUT3 : transporteur vésiculaire au glutamate 3  
VIP : peptide vasoactif  
XE-991 : « *10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthracenone* »  
YFP : « *yellow fluorescent protein* »  
ZD-7288 : « *4-ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyridinium chloride* »

## AVANT-PROPOS

---

Dans le cadre de cette thèse intitulée « Base moléculaire et rôle du courant potassique transitoire ( $I_A$ ) des interneurons de l'hippocampe chez le rongeur », j'ai étudié l'implication d'un courant ionique  $K^+$ , le courant  $I_A$ , dans la fonction des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe de rat. De plus, j'ai tenté de préciser l'identité des protéines qui forment et modulent les canaux à la base de ce courant.

Avant d'exposer le détail des résultats expérimentaux obtenus, une introduction générale décrira différents concepts essentiels à la compréhension de mon projet de thèse et servira à mettre le sujet de recherche en contexte. De plus, cette introduction témoignera de l'état de l'avancement des connaissances dans les domaines reliés aux travaux expérimentaux présentés dans cette thèse.

Pour débiter cette introduction générale, il sera question de l'implication de l'hippocampe dans la mémoire et l'apprentissage. Ensuite, l'organisation fonctionnelle et les mécanismes importants pour la fonction de cette structure seront décrits. Une attention particulière sera portée au rythme thêta qui pourrait constituer un processus critique dans l'hippocampe. Les mécanismes de génération du rythme thêta hippocampique et l'apport des interneurons inhibiteurs locaux à ce rythme seront par la suite exposés. L'emphasis sera mise sur une population d'interneurons de l'hippocampe qui présentent des propriétés rythmiques intrinsèques qui contribueraient vraisemblablement au rythme thêta global. Finalement, une description de courants et de canaux ioniques ainsi que de protéines accessoires aux canaux ioniques sera effectuée dans le but de bien mettre en contexte la problématique soulevée par le corps de la présente thèse.

## **CHAPITRE I. INTRODUCTION GENERALE**

---

### **1.1 IMPLICATION DU LOBE TEMPORAL DANS L'APPRENTISSAGE ET LA MÉMOIRE**

L'apprentissage est le processus par lequel le système nerveux acquiert de nouvelles informations. La mémoire réfère plutôt à l'encodage et au stockage d'informations dans les structures cérébrales de même qu'au processus les rendant accessibles pour une utilisation future (Purves & Roucoux 1999 ; Kandel et al. 2000). Depuis longtemps, ces fonctions complexes et fascinantes stimulent les scientifiques à découvrir les mécanismes neurobiologiques qui les sous-tendent.

#### **1.1.1 CONTRIBUTION DU LOBE TEMPORAL A LA MEMOIRE HUMAINE**

Avant de s'attarder à la compréhension détaillée des mécanismes qui sont à la base de la mémoire, les scientifiques ont tout d'abord dû répondre à une question en apparence simple mais qui revêt une importance capitale : où sont localisées les fonctions cognitives (dont la mémoire) dans le cerveau ? Au XIX<sup>e</sup> siècle, Franz Joseph Gall suggéra que le cortex cérébral comporterait des centres distincts responsables de fonctions spécifiques alors que Pierre Paul Broca démontra que des lésions à des régions spécifiques du cerveau engendrent des déficits cognitifs spécifiques (concept de « localisation corticale » des fonctions cognitives) (Milner et al. 1998 ; Kandel & Pittenger 1999). De son côté, le français Pierre Flourens suggéra plutôt que toutes les parties des hémisphères cérébraux seraient en mesure d'accomplir la totalité des fonctions de l'hémisphère (concept d'« équipotentialité » des régions corticales) (Milner et al. 1998 ; Kandel & Pittenger 1999). Ces concepts opposés ont été à la base de débats jusqu'au milieu du XX<sup>e</sup> siècle.

C'est alors que William Scoville, neurochirurgien américain, et Brenda Milner, neuropsychologue canadienne d'origine britannique, ont décrit pour la première fois le cas d'un patient unique, H.M. (Scoville & Milner 1957). H.M., un homme ayant souffert pendant dix ans de crises d'épilepsie sévères en raison de dommage au cerveau subit à l'enfance, était incapable de mener une vie adulte normale. Dès lors, Scoville lui retira chirurgicalement les structures médiales du lobe temporal de manière bilatérale (Scoville

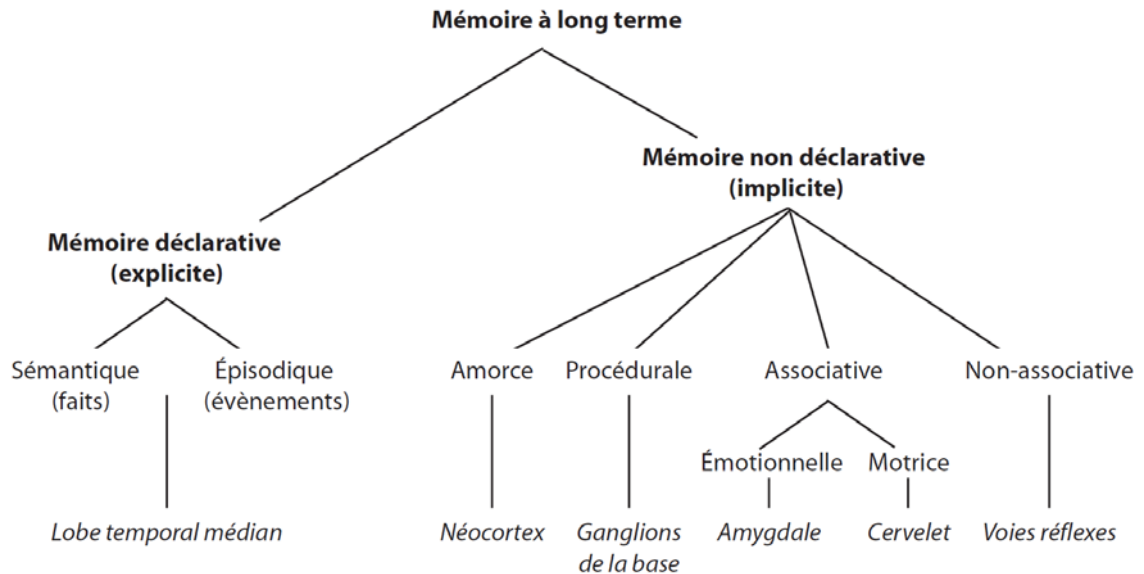
& Milner 1957 ; Milner et al. 1998). L'intervention permit de diminuer les crises épileptiques du patient mais elle engendra des déficits de mémoire notables. En effet, H.M. avait conservé une mémoire à long terme normale pour des événements ayant eu lieu plusieurs années avant l'opération mais il ne pouvait plus se remémorer les événements qui précédaient l'intervention de seulement quelques années (amnésie rétrograde partielle). Il ne présentait pas de troubles du langage ou du vocabulaire, son quotient intellectuel était normal et il possédait des capacités de mémorisation à court terme (de quelques secondes à quelques minutes) normales (Milner et al. 1998 ; Kandel et al. 2000). Pourtant, H.M. avait perdu la capacité de transformer de nouvelles mémoires à court terme en mémoires à long terme. Il était incapable de retenir pour plus de quelques minutes de nouvelles informations concernant des gens, des endroits ou des objets (amnésie antérograde à long terme) (Milner et al. 1998 ; Kandel et al. 2000). Ainsi, les travaux pionniers de Scoville, Milner et de leurs collaborateurs ont permis de déterminer que la mémoire à court terme et la mémoire à long terme font appel à des structures cérébrales différentes. Ils ont clairement révélé l'implication du lobe temporal médian dans la transformation de mémoires à court terme en mémoires à long terme (Kandel & Pittenger 1999; Kandel et al. 2000). Finalement, ces travaux ont montré que des régions uniques du cerveau ne pouvaient sous-tendre toutes les fonctions cérébrales (Milner et al. 1998 ; Kandel & Pittenger 1999; Andersen 2007).

### **1.1.2 MEMOIRES DECLARATIVE ET NON DECLARATIVE**

La description des cas de H.M. et d'autres patients ayant subi des ablations chirurgicales ou des lésions au cerveau ont poussé les chercheurs à développer des modèles animaux pour étudier la mémoire. Initialement, plusieurs études chez les primates et les rats ne parvenaient pas à confirmer le lien entre le lobe temporal médian et diverses tâches d'apprentissage et de mémoire à long terme (Milner et al. 1998). Cependant, il a subséquemment été montré que différents types de mémoires à long terme existent et que plusieurs des tâches auxquelles les animaux de laboratoire avaient été initialement soumis ne sollicitaient pas la mémoire dépendante du lobe temporal médian. Au tournant des années 80, les travaux de Squire et de ses collaborateurs ont grandement contribué à l'établissement d'une classification détaillée des types de mémoire à long terme. Ces



mémoires sont classées selon la manière dont les informations sont stockées et rappelées (**Fig. 1**) (Squire & Zola 1996 ; Milner et al. 1998 ; Kandel et al. 2000).



**FIGURE 1. Systèmes de mémoire à long terme chez les mammifères**

Taxonomie des types et sous-types de mémoires à long terme ainsi que les structures spécifiques du cerveau qui leurs sont associées. Figure adaptée de Milner et al. (1998) et Kandel et al. (2000).

Premièrement, la **mémoire déclarative** (ou explicite) dépend de l'intégrité du lobe temporal médian et permet le rappel conscient de faits ou d'événements. Elle est flexible et fait appel à l'association de multiples segments d'information (Kandel et al. 2000). Elle peut être divisée en deux sous-groupes, (1) la *mémoire sémantique* qui concerne le stockage et le rappel de connaissances objectives, comme celles apprises à l'école ou dans les livres et (2) la *mémoire épisodique* qui réfèrent aux événements (**Fig. 1**) (Squire & Zola 1996 ; Milner et al. 1998 ; Kandel et al. 2000).

Deuxièmement, la **mémoire non déclarative** (ou implicite) est plutôt inconsciente et fait appel à diverses structures. Elle est à la base des changements dans les capacités de répondre de manière appropriée aux stimuli et constitue le résultat de conditionnement ou d'apprentissage (Squire & Zola 1996 ; Kandel et al. 2000). Contrairement à la mémoire déclarative, la mémoire non déclarative est peu flexible et nécessite habituellement des conditions d'encodage et de rappel semblables. Dans le cas de la mémoire non déclarative,

la performance change en fonction de l'expérience, ce qui justifie l'utilisation du terme « mémoire » malgré que cette performance soit modifiée sans qu'il n'y ait d'accès conscient à des expériences passées (Kandel et al. 2000). La mémoire non déclarative est divisée en quatre sous-types : (1) *Mémoire d'amorce* : mémoire caractérisée par une modification de l'habileté à reconnaître ou à identifier des stimuli (objets, dessins, mots, etc.) suite à la présentation récente de ces mêmes signaux. (2) *Mémoire procédurale* : mémoire des habiletés motrices qui fait appel au striatum. (3) *Mémoire associative* : mémoire qui permet de conditionner la relation entre un stimulus et sa conséquence, impliquant l'amygdale et le cervelet. (4) *Mémoire non-associative* : mémoire permettant de retenir les propriétés d'un stimulus unique et d'y réagir de façon appropriée, impliquant les voies réflexes. (**Fig. 1**) (Squire & Zola 1996 ; Milner et al. 1998 ; Kandel et al. 2000).

### 1.1.3 IMPORTANCE DE L'HIPPOCAMPE POUR LA MÉMOIRE À LONG TERME

Conjointement avec l'identification détaillée des multiples systèmes de mémoires, les connaissances sur les structures anatomiques du lobe temporal médian impliquées dans la mémoire déclarative ont été précisées. En effet, il a été démontré que l'hippocampe, le gyrus dentelé, le complexe subiculaire et le cortex entorhinal (ces structures constituent la formation hippocampique), de même que les cortex périrhinal et parahippocampique sont impliqués dans la mémoire déclarative (Squire & Zola 1996 ; Andersen 2007). Des évidences cliniques suggèrent qu'une lésion d'une de ces structures engendre des effets significatifs sur la mémoire déclarative. À titre d'exemple, le patient R.B. ayant subi une lésion spécifique aux cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe, présentait un déficit de mémoire déclarative qualitativement similaire à celui observé chez H.M. mais quantitativement moins important (Zola-Morgan et al. 1986). De plus, il a été montré que des lésions de l'hippocampe chez des rongeurs entraînent des défauts de mémoire spatiale et contextuelle. En effet, des cellules individuelles hippocampiques codent pour des informations spatiales (O'Keefe & Dostrovsky 1971). Finalement, des expériences en imagerie fonctionnelle suggèrent que l'hippocampe de l'hémisphère droit serait plus sollicité par la mémoire visuo-spatiale tandis que l'hippocampe de l'hémisphère dominant gauche aurait une activité plus intense lors de tâches sollicitant la mémoire verbale ou narrative des objets, des mots et des personnes (Kandel et al. 2000 ; Burgess et al. 2002).

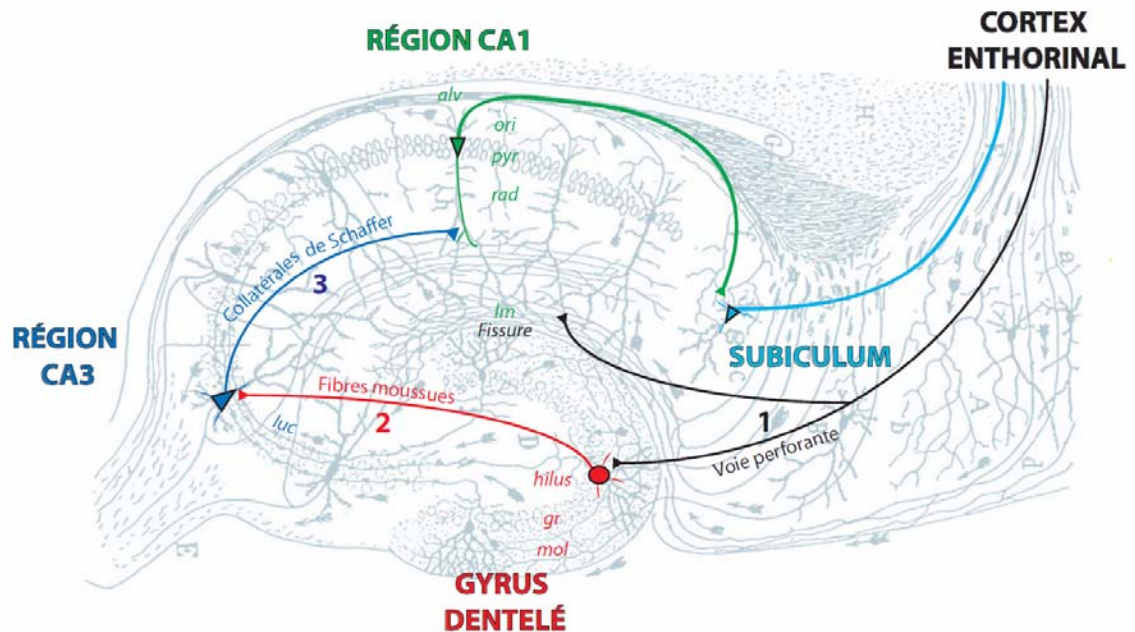
#### 1.1.4 STOCKAGE A LONG TERME DES INFORMATIONS DANS LE NEOCORTEX

Puisque des patients amnésiques ont la capacité de se remémorer des connaissances acquises avant l'apparition de lésions à l'hippocampe, il semble que cette dernière structure ne constitue qu'une station temporaire de la mémoire à long terme qui transfère lentement l'information dans le système de stockage néocortical (Squire & Alvarez, 1995). De plus, diverses régions associatives du néocortex apparaissent comme critiques pour le stockage à long terme d'information (Purves & Roucoux 1999 ; Kandel et al. 2000). Cette idée est supportée par le fait que des patients ayant subi des lésions au cortex associatifs possèdent des lacunes dans le rappel de connaissances explicites (Squire & Alvarez, 1995 ; Kandel et al. 2000). À titre d'exemple, des travaux réalisés avec de tels patients ont révélé que le lexique du vocabulaire serait localisé dans le cortex associatif du lobe temporal supérieur ainsi que dans l'aire de Wernicke (Purves & Roucoux 1999).

Pour conclure cette première section traitant du lobe temporal médian, il est possible de mentionner qu'une de ces structures, l'hippocampe, est aujourd'hui l'une des régions du système nerveux central (SNC) les plus étudiées. Il est clair que son implication dans la mémoire déclarative a contribué à susciter un tel intérêt. Dans la section qui suit, l'organisation fonctionnelle de l'hippocampe et des autres structures qui composent la formation hippocampique sera décrite.

#### 1.2. ORGANISATION DE LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE

L'hippocampe est une structure localisée dans le lobe temporal médian. L'origine de l'appellation hippocampe remonte au XVI<sup>e</sup> siècle, alors que le terme *hippocampus* (grec pour hippocampe) était utilisé par l'anatomiste Arantius pour référer à cette structure, en raison de sa ressemblance avec le poisson tropical du même nom. L'appellation *cornu ammonis* (latin pour corne d'Ammon) est aussi utilisée pour faire référence à l'hippocampe, désignant les régions de l'hippocampe CA1, CA2 et CA3 (Lorente de No 1934 ; Andersen 2007). L'hippocampe fait partie d'un système fonctionnel nommé **formation hippocampique** qui inclut aussi le gyrus dentelé, le complexe subiculaire et le cortex entorhinal (**Fig. 2**) (Squire & Zola 1996 ; Sweatt 2004 ; Andersen 2007).



### FIGURE 2. Organisation générale de la formation hippocampique

Schéma représentant l'organisation en couches de l'hippocampe et du gyrus dentelé de même que les principales voies excitatrices impliquant les structures de la formation hippocampique. Les nombres 1-3 indiquent les trois relais de la boucle trisynaptique hippocampique. Alv, *alveus*; ori, *stratum oriens*; pyr, *stratum pyramidale*; rad, *stratum radiatum*; lm, *stratum lacunosum-moleculare*; luc, *stratum lucidum*; gr, couche granulaire; mol, couche moléculaire. Figure adaptée d'un schéma par Ramon y Cajal (1911), tiré de Andersen (2007).

Les cellules principales du gyrus dentelé et de l'hippocampe font partie d'un **circuit neuronal trisynaptique excitateur** qui utilise le glutamate comme neurotransmetteur et par lequel l'information issue du cortex entorhinal retourne à cette structure en passant par les voies (1) perforante, (2) des fibres moussues et (3) des collatérales de Schaffer (**Fig. 2**) (Freund & Buzsaki 1996 ; Kandel et al. 2000). Les caractéristiques de ces voies seront décrites individuellement dans les sections qui suivent.

#### 1.2.1 COMPLEXE SUBICULAIRE ET CORTEX ENTORHINAL

Le terme complexe subiculaire est utilisé pour référer aux régions de la formation hippocampique qui incluent le subiculum, le présubiculum et le parasubiculum (Amaral & Witter 1989 ; Andersen 2007). Le subiculum est adjacent à la région CA1 de

l'hippocampe et les projections des collatérales de Schaffer prennent fin à la limite entre ces deux structures. Chez les rongeurs, ce site correspond aussi à l'endroit où les cellules principales compactes du *stratum pyramidale* de la région CA1 laissent place à une couche de cellules principales plus large dans le subiculum (Amaral & Witter 1989 ; Andersen 2007). Le subiculum constitue une source majeure d'efférences qui projettent vers des régions telles que le présubiculum, parasubiculum, le cortex entorhinal et le néocortex. (Andersen 2007). Le présubiculum est adjacent au subiculum et possède une couche compacte de petites cellules pyramidales alors que le parasubiculum est caractérisé par une couche II cunéiforme avec des cellules plus larges et moins compactes que dans le présubiculum (Andersen 2007).

Le cortex entorhinal joue un rôle critique pour le flux d'information dans la formation hippocampique. En effet, cette structure est le point d'entrée dans la formation hippocampique de la majorité des informations sensorielles. De plus, c'est la voie de sortie principale des informations traitées par l'hippocampe qui sont relayées au néocortex (Andersen 2007). Chez les rongeurs, le cortex entorhinal est localisé dans la région caudale du lobe temporal. Selon une récente nomenclature, cette région corticale peut être divisée en six couches, dont quatre cellulaires (II, III, V et VI) et deux acellulaires (I et IV) (Andersen 2007). Le cortex entorhinal établit des connexions intrinsèques, commissurales ainsi que d'autres qui ciblent l'hippocampe, le subiculum et différentes régions néocorticales (Amaral & Witter 1989). En particulier, des axones quittent le cortex entorhinal pour établir des synapses sur les cellules granulaires du gyrus dentelé et forment la **voie perforante** qui est le premier relais de la boucle trisynaptique, (**Fig. 2**) (Freund & Buzsaki 1996 ; Kandel et al. 2000). Il est à noter que certaines projections entorhinales de la voie perforante atteignent aussi directement les cellules pyramidales et les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe ainsi que le subiculum pour former la **voie temporo-ammonique** (Witter et al. 2000). Il a récemment été suggéré que des informations spatiales pourraient atteindre l'hippocampe par cette dernière voie (Moser et al. 2008). En effet, certaines cellules de projection du cortex entorhinal, nommées cellules grilles « grid cells » présentent une décharge associée à l'espace dans lequel l'animal se trouve qui forme une grille décrivant l'environnement exploré (Hafting et al. 2005 ; Moser et al. 2008).

### 1.2.2 GYRUS DENTÉLÉ

Puisqu'il est la cible de la majorité des afférences de la voie perforante provenant du cortex entorhinal, le gyrus dentelé peut être considéré comme étant la première structure de la boucle trisynaptique de la formation hippocampique (Freund & Buzsaki 1996). Le gyrus dentelé est composé de trois couches. La **couche moléculaire** est la plus rapprochée de la fissure hippocampique et contient peu de cellules. La **couche granulaire** contient les cellules principales du gyrus dentelé, les cellules granulaires. Les couches granulaire et moléculaire forment un agencement en forme de V ou de U qui renferme la troisième et dernière couche cellulaire du gyrus dentelé, la **couche de cellules polymorphiques** ou *hilus* (**Fig. 2**) (Amaral & Witter, 1989 ; Freund & Buzsaki 1996)

Le second relais de la boucle trisynaptique, la **voie des fibres moussues**, émerge des projections axonales des cellules granulaires du gyrus dentelé qui ciblent les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe (**Fig. 2**) (Freund & Buzsaki 1996 ; Kandel et al. 2000).

### 1.2.3 L'HIPPOCAMPE

#### 1.2.3.1 Organisation laminaire

L'hippocampe comporte trois régions (**CA1**, **CA2** et **CA3**, la région CA2 demeure peu caractérisée). La corne d'Ammon arbore une organisation laminaire (Ramón y Cajal 1893 ; Lorente de No 1934 ; Freund & Buzsaki 1996). La couche de cellules principales (les cellules pyramidales) est appelée la couche pyramidale ou **stratum pyramidale** (Lopes da Silva et al., 1990) . Elle possède une forte densité cellulaire (**Fig. 2**). La couche **stratum oriens** est située en surface par rapport au **stratum pyramidale** (**Fig. 2**). Elle contient quelques neurones, dont plusieurs interneurons inhibiteurs, ainsi que les dendrites basales des cellules pyramidales (Freund & Buzsaki 1996). Le **stratum oriens** est aussi le site de connexions CA3-CA3 associationnelles et de connexions CA3-CA1. Adjacent au **stratum oriens** on retrouve une région mince contenant des fibres qui est nommée **alveus** (**Fig. 2**) (Lopes da Silva et al. 1990). Dans la région CA3 (et non dans les régions CA1 et CA2), on retrouve une couche étroite adjacente à la couche **stratum pyramidale** qui se nomme **stratum lucidum** (**Fig. 2**) et qui est la couche réceptrice de la voie des fibres moussues. La

couche *stratum radiatum* est adjacente au *stratum lucidum* dans la région CA3 et est immédiatement juxtaposée au *stratum pyramidale* dans les régions CA1 et CA2 (**Fig. 2**). Le *stratum radiatum* est le site de connexions CA3-CA3 associationnelles et CA3-CA1. La couche la plus profonde de l'hippocampe se nomme *stratum lacunosum-moleculare* et est la cible d'inputs entorhinaux (**Fig. 2**) (Lopes da Silva et al. 1990; Freund & Buzsaki 1996).

#### 1.2.3.2 Cellules pyramidales et transfert d'information

Les cellules pyramidales de l'hippocampe exhibent un corps cellulaire triangulaire, une arborisation dendritique basale qui s'étend dans le *stratum oriens* et une arborisation dendritique apicale qui s'étend aux *strata radiatum* et *lacunosum-moleculare*, jusqu'à la fissure hippocampique (**Fig. 2**) (Andersen 2007). Les cellules pyramidales de la région CA3 sont généralement plus grosses que celles de la région CA1 et présentent une arborisation dendritique hétérogène, ce qui n'est pas le cas chez les cellules pyramidales de la région CA1 (Andersen 2007). La grande homogénéité d'arborisation dendritique retrouvée chez les cellules pyramidales de la région CA1 ne sous-tend toutefois pas une homogénéité fonctionnelle (Andersen 2007). En effet, bien que les cellules pyramidales du CA1 soient souvent considérées comme formant une population uniforme, les différences au niveau des inputs synaptiques qu'elles reçoivent et de leurs réponses incitent certains chercheurs à les séparer en classes distinctives (Somogyi & Klausberger 2005).

Tel que mentionné précédemment, le second relais de la boucle trisynaptique hippocampique cible les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe (**Fig. 2**). Effectivement, les projections axonales des cellules granulaires du gyrus dentelé forment la voie des fibres moussues qui prend fin par des terminaisons caractéristiques, les boutons « en passant ». Ces terminaisons établissent des synapses sur les dendrites des cellules pyramidales de la région CA3 (Freund & Buzsaki 1996 ; Kandel et al. 2000). À leur tour, les cellules pyramidales de la région CA3 sont à la base de la troisième et dernière voie du circuit trisynaptique, la **voie des collatérales de Schaffer**. Les axones des cellules pyramidales de la région CA3 contactent les dendrites des cellules pyramidales de la région CA1 principalement dans les *strata oriens* et *radiatum*. Les axones des cellules

pyramidales du CA1 établissent des projections le long de l'*alveus* qui ciblent le subiculum et le cortex entorhinal (**Fig. 2**) (Freund & Buzsaki 1996 ; Kandel et al. 2000 ; Andersen 2007).

### ***1.2.3.3 Diversité des interneurons du réseau inhibiteur hippocampique***

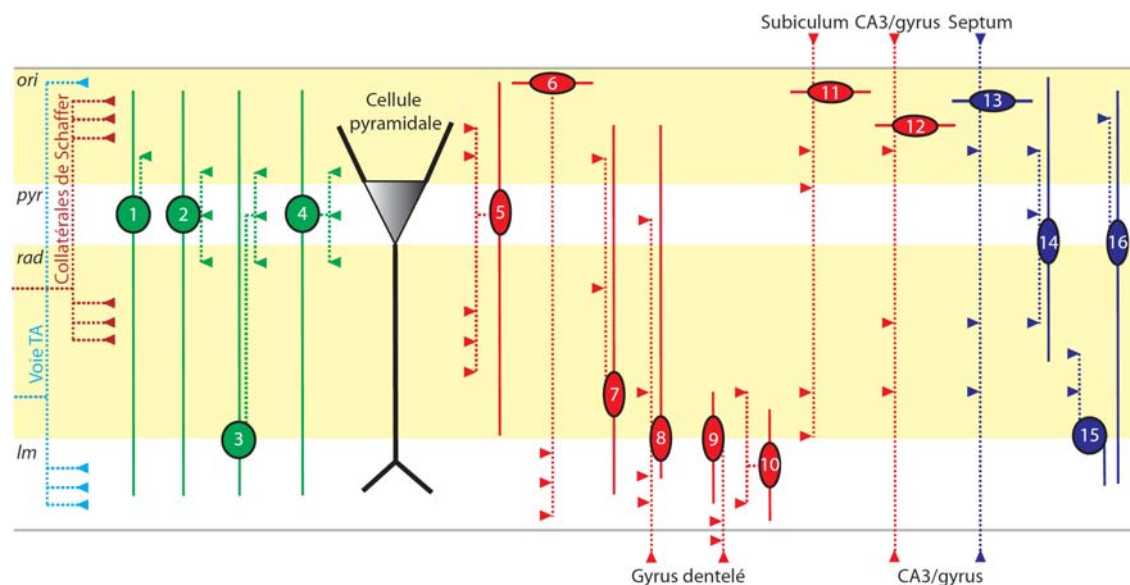
Les données anatomiques et morphologiques rapportées par Ramón y Cajal et Lorente de No révèlent que les cellules pyramidales sont de loin les neurones les plus nombreux dans l'hippocampe quoique d'autres types neuronaux sont aussi présents (Ramón y Cajal 1893 ; Lorente de No 1934). En effet, l'hippocampe possède une variété d'interneurones inhibiteurs dont les axones projettent localement et qui représentent environ 10% de la population neuronale (Freund & Buzsaki 1996 ; McBain & Fisahn 2001). Les interneurons libèrent l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur et engendrent généralement une hyperpolarisation membranaire dans les cellules ciblées (Freund & Buzsaki 1996 ; Andersen 2007). Les interneurons modulent la fonction des cellules pyramidales en contrôlant leur taux de décharge, en déterminant un domaine temporel pour la décharge et en synchronisant l'activité de plusieurs cellules pyramidales (McBain & Fisahn 2001 ; Klausberger 2009).

Les interneurons corticaux forment une population très hétérogène sur les plans morphologique, moléculaire et fonctionnel (McBain & Fisahn 2001 ; Ascoli et al. 2008). Classiquement, ils ont souvent été regroupés sur la base d'un ou plusieurs critères tels que (1) les propriétés morphologiques (Ramón y Cajal 1893 ; Lorente de No 1934; Amaral 1978 ; Somogyi et al. 1983), (2) l'expression de marqueurs moléculaires (comme des neuropeptides ou des protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Acsady et al. 1996 ; Cope et al. 2002) et (3) les caractéristiques physiologiques et biophysiques (Maccaferri & McBain 1996 ; Martina & Jonas 1997 ; Klausberger et al. 2003).

Somogyi et Klausberger (Somogyi & Klausberger 2005) sont les auteurs d'une classification récente et détaillée des interneurons de la région CA1 de l'hippocampe. Elle prend en considération plusieurs facteurs dont les patrons d'arborisation dendritique et axonale de même que l'expression de marqueurs moléculaires. Cette classification



distingue seize types d'interneurones dans la région CA1 (Fig. 3) (Somogyi & Klausberger 2005) :



**FIGURE 3. Diversité des interneurones de la région CA1 de l'hippocampe**

Schéma illustrant les différentes classes d'interneurones de la région CA1 de l'hippocampe. Les interneurones innervant les cellules pyramidales sont présentés en vert ou rouge alors que ceux qui innervent principalement d'autres interneurones sont présentés en bleu. Les dendrites sont représentées par des lignes pleines alors que les axones sont représentés par des lignes pointillées ponctuées de triangles schématisant les terminaisons axonales principales. Ori, *stratum oriens*; pyr, *stratum pyramidale*; rad, *stratum radiatum*; lm, *stratum lacunosum-moleculare*; TA, temporo-ammonique. Figure adaptée de Somogyi & Klausberger (2005).

**1. Cellules axo-axoniques ( $PV^+$ ).** Ces interneurones, aussi connus sous l'appellation neurones « chandeliers » (Buhl et al. 1994) (Freund & Buzsaki 1996), établissent des synapses sur le segment initial de l'axone des cellules pyramidales et activent des récepteurs postsynaptiques  $GABA_A$  (Somogyi & Klausberger 2005). Dans la majorité des cas, les cellules axo-axoniques peuvent être reconnues par la forme de leurs terminaisons axonales. Typiquement, les cellules axo-axoniques exhibent des dendrites radiales qui s'étendent de manière extensive du *stratum oriens* jusqu'au *stratum lacunosum-moleculare*. Ces interneurones expriment la parvalbumine (PV) dans leur soma, dendrites et terminaisons axonales (Somogyi & Klausberger 2005).

**2. Cellules à panier (classe 1 ; PV<sup>+</sup>, CCK<sup>-</sup>).** Les neurones à panier (ou « basket cells ») établissent des synapses sur les somas et les dendrites proximales des cellules pyramidales de même que sur d'autres cellules à panier PV<sup>+</sup> et d'autres interneurons non identifiés (Somogyi & Klausberger 2005). L'arborisation axonale peut être restreinte à la couche pyramidale ou se répandre aux *strata oriens* et *radiatum*. Ces cellules possèdent des dendrites radiales du *stratum oriens* au *stratum lacunosum-moleculare*. Les interneurons à panier PV<sup>+</sup> qui n'expriment pas la cholécystokinine (CCK)<sup>-</sup> activent des récepteurs postsynaptiques GABA<sub>A</sub> (Somogyi & Klausberger 2005).

**3. Cellules à panier (classe 2 ; CCK<sup>+</sup>, VIP<sup>+</sup>, VGLUT3<sup>-</sup>, PV<sup>-</sup>).** Ces interneurons à paniers expriment la CCK ainsi que le peptide intestinal vasoactif (VIP). Les cellules de cette classe établissent des synapses GABAergiques sur les mêmes cibles que les cellules à paniers de la classe 2 et mènent aussi à l'activation de récepteurs postsynaptiques GABA<sub>A</sub> (Somogyi & Klausberger 2005). Ces cellules à panier exposent des arborisations axonales et dendritiques similaires à celles retrouvées chez les interneurons à panier de la classe 2 (Somogyi & Klausberger 2005).

**4. Cellules à panier (classe 3 ; CCK<sup>+</sup>, VGLUT3<sup>+</sup>, VIP<sup>-</sup>, PV<sup>-</sup>).** À l'exception de l'expression du transporteur vésiculaire au glutamate 3 (VGLUT3) et de l'absence de signal pour le VIP, aucune propriété ne différencie ces cellules à panier de celles de la classe 3 (Somogyi & Klausberger 2005).

**5. Cellules bistratifiées (PV<sup>+</sup>, somatostatine<sup>+</sup>, NPY<sup>+</sup>, sous-unité α1 du récepteur GABA<sub>A</sub>, CCK<sup>-</sup>).** Décrites pour la première fois par Buhl et collaborateurs (Buhl et al. 1994), ces cellules présentent une arborisation axonale dans les *strata oriens* et *radiatum* (Buhl et al. 1994). Les dendrites radiales de ces interneurons pénètrent rarement le *stratum lacunosum-moleculare*. Les cellules bistratifiées agissent sur des récepteurs GABA<sub>A</sub> dendritiques et innervent aussi des interneurons. Elles expriment la somatostatine, le neuropeptide Y (NPY) et la sous-unité α1 du récepteur GABA<sub>A</sub> (Somogyi & Klausberger 2005).

**6. Cellules O-LM (PV<sup>+</sup>, somatostatine<sup>+</sup>, forte expression de mGluR1α<sup>+</sup> et décorées d'inputs présynaptiques mGluR7a).** Ces interneurons possèdent des dendrites qui

s'étendent horizontalement dans le *stratum oriens* et des terminaisons axonales principalement distribuées dans le *stratum lacunosum-moleculare* (McBain et al. 1994). Les cellules O-LM expriment faiblement la PV et fortement des récepteurs glutamatergiques métabotropes mGluR1 $\alpha$  somatodendritiques et elles reçoivent des terminaisons axonales exprimant des récepteurs mGluR7. Elles innervent les dendrites distales des cellules pyramidales de même que d'autres interneurons, et agissent via l'activation des récepteurs postsynaptiques de type GABA<sub>A</sub> (Somogyi & Klausberger 2005).

**7. Cellules associées aux collatérales de Schaffer (CCK<sup>+</sup>, calbindine<sup>+</sup>, somatostatine<sup>-</sup>, NPY<sup>-</sup>).** Le corps cellulaire de ces interneurons est localisé dans le *stratum radiatum*, en bordure du *stratum lacunosum-moleculare* (Vida et al. 1998). Ces interneurons se retrouvent principalement dans le *stratum radiatum* et innervent les dendrites apicales et basales des cellules pyramidales en conjonction avec les collatérales de Schaffer et les voies commissurales. Ils innervent aussi des interneurons (Vida et al. 1998). Les axones de ces cellules activent des récepteurs GABA<sub>A</sub> présents sur des cellules pyramidales et des interneurons (Somogyi & Klausberger 2005).

**8. Cellules *lacunosum-moleculare/radiatum* associées à la voie perforante.** Le corps cellulaire de ces neurones est situé à la bordure des *strata radiatum* et *lacunosum-moleculare*. Ces cellules possèdent de larges arborisations dendritiques couvrant pratiquement toutes les couches de la région CA1 et atteignant l'*alveus* (Somogyi & Klausberger 2005). Les axones sont centrés sur le *stratum lacunosum-moleculare* et peuvent atteindre le *stratum radiatum* et le gyrus dentelé. Ces interneurons expriment probablement la CCK et la calbindine (Somogyi & Klausberger 2005).

**9. Cellules *lacunosum-moleculare* associées à la voie perforante.** Le corps cellulaire de ces interneurons se localise dans le *stratum lacunosum-moleculare* ou à la bordure des *strata radiatum* et *lacunosum-moleculare*. Ces cellules possèdent des dendrites qui atteignent le *stratum radiatum* (Somogyi & Klausberger 2005). Leurs terminaisons axonales sont associées aux inputs entorhinaux dans la région CA1 et s'étendent aussi jusqu'au complexe subiculaire et au gyrus dentelé (Somogyi & Klausberger 2005).

**10. Cellules neurogliaformes.** Ce sont des neurones inhibiteurs qui se retrouvent dans les *strata radiatum* et *lacunosum-moleculare*, exhibant un champ dendritique petit et dense (Vida et al. 1998 ; Somogyi & Klausberger 2005). Ces cellules présentent une arborisation axonale caractéristique formant un nuage local dense qui agit sur les cellules pyramidales probablement via des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Somogyi & Klausberger 2005).

**11. Cellules trilaminaires (récepteurs m2<sup>+</sup>, décorées d'inputs présynaptiques mGluR8a, calbindine<sup>-</sup>).** Le corps cellulaire et les dendrites horizontales de ces cellules sont retrouvés dans le *stratum oriens*. Les axones contactent les *strata oriens*, *pyramidale* et *radiatum*, d'où le qualificatif « trilaminaire » (Somogyi & Klausberger 2005). Ces interneurones expriment des récepteurs cholinergiques muscariniques m2 somatodendritiques et projettent, entre autre, au niveau du subiculum. Ils reçoivent des afférences exprimant des récepteurs mGluR8a dans leurs terminaisons axonales (Somogyi & Klausberger 2005).

**12. Cellules à rétroprojection.** Le corps cellulaire de ces neurones est retrouvé dans le *stratum oriens*. Les arborisations axonales importantes de ces interneurones innervent les régions CA1 et CA3 de même que le *hilus* du gyrus dentelé. Peu de choses sont connues sur le profil d'expression de marqueurs moléculaires et les connexions synaptiques engendrées par ces cellules (Somogyi & Klausberger 2005).

**13. Cellules à projection hippocamposeptales (calbindine<sup>+</sup>, somatostatine<sup>+</sup>).** Ces cellules innervent principalement d'autres interneurones et leur soma est localisé dans le *stratum oriens*. Ces neurones possèdent des dendrites horizontales et une arborisation axonale dans les couches *oriens*, *pyramidale* et *radiatum* mais projettent aussi au septum et à d'autres régions de la formation hippocampique (Freund & Buzsaki 1996 ; Somogyi & Klausberger 2005).

**14. Cellules spécifiques aux interneurones de type I (calretinine<sup>+</sup>).** Ces interneurones ont leur corps cellulaire dans les *strata oriens*, *pyramidale* ou *radiatum*. Ils innervent principalement d'autres interneurones et leurs dendrites traversent plusieurs couches de la région CA1 (Somogyi & Klausberger 2005).

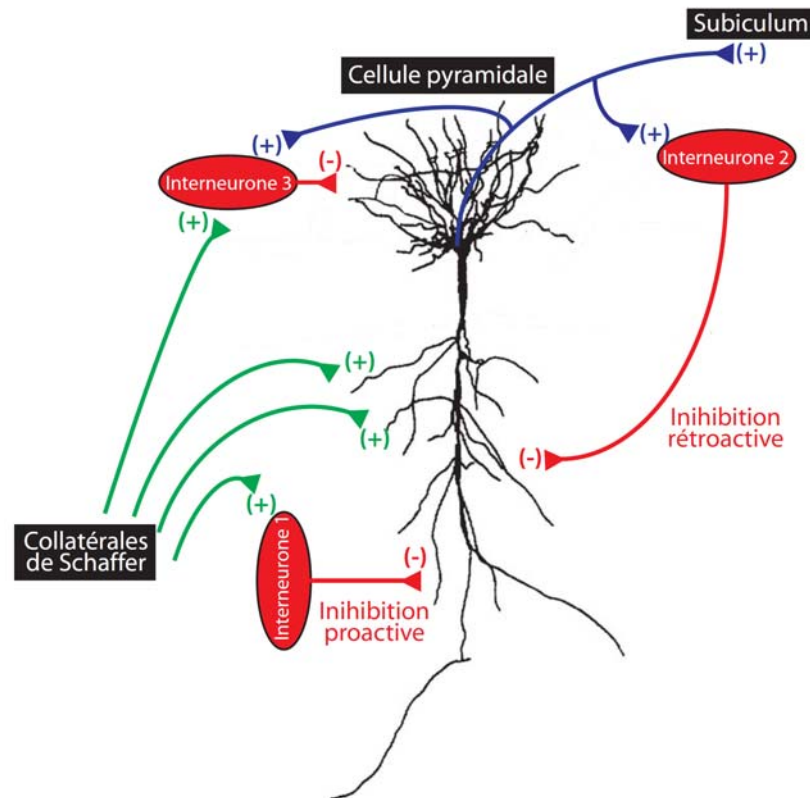
**15. Cellules spécifiques aux interneurons de type II (VIP<sup>+</sup>).** Neurones dont le corps cellulaire se localise dans le *stratum radiatum*, à la bordure du *stratum lacunosum-moleculare* et qui innervent principalement d'autres interneurons (principalement les cellules à panier exprimant la CCK et la VIP). Leurs dendrites sont retrouvées dans la couche *lacunosum-moleculare* (Somogyi & Klausberger 2005).

**16. Cellules spécifiques aux interneurons de type III (VIP<sup>+</sup>, calretinine<sup>+</sup>, mGluR7a<sup>+</sup>).** Interneurones qui innervent principalement d'autres interneurons et dont le corps cellulaire se situe dans les *strata pyramidale* et *radiatum*. Ils présentent des dendrites radiales qui parcourent la majorité des couches de la région CA1 (Somogyi & Klausberger 2005). Ces cellules innervent principalement les cellules O-LM (Somogyi & Klausberger 2005).

#### ***1.2.3.4 Modes d'inhibition des cellules pyramidales par les interneurons***

Dans la région CA1, deux modes d'inhibition des cellules pyramidales par les interneurons (reposant sur la circuiterie du réseau hippocampique) sont retrouvés. Tout d'abord, les interneurons peuvent générer une **inhibition proactive**. Dans ce cas, les interneurons sont activés par des afférences excitatrices (qui ciblent aussi les cellules pyramidales) avant que les cellules pyramidales ne soient activées. Cela permet la décharge des interneurons, ce qui entraîne une réponse inhibitrice dans les cellules pyramidales ciblées par ces interneurons, sans nécessiter l'activation préalable de cellules principales (**Fig. 4**) (Lacaille & Schwartzkroin 1988b ; Freund & Buzsaki 1996 ; Nurse & Lacaille 1997). Ce mode permet une inhibition liée à l'arrivée des inputs excitateurs (Nurse & Lacaille 1997). Puis, les interneurons peuvent générer une **inhibition rétroactive** (ou récurrente). Cette situation n'implique pas l'activation directe des interneurons par des afférences excitatrices. Leur activation a plutôt lieu suite à la décharge de cellules pyramidales qui elle, est induite par l'arrivée d'inputs excitateurs. La décharge des cellules pyramidales permet d'activer les interneurons locaux qui peuvent ensuite inhiber de manière récurrente ces mêmes cellules pyramidales (**Fig. 4**) (Freund & Buzsaki 1996 ; Nurse & Lacaille 1997 ; Andersen 2007). Finalement, il est à noter que

certaines interneurones peuvent participer à ces deux types d'inhibition (**Fig. 4**) (Sik et al. 1995).



**FIGURE 4. Différents modes d'inhibition**

Schéma représentant des interactions synaptiques entre une cellule pyramidale et des interneurones de la région CA1 de l'hippocampe. L'interneurone 1 représente l'**inhibition proactive** alors que l'interneurone 2 illustre l'**inhibition rétroactive**. L'interneurone 3 illustre une cellule ayant recours aux deux modes d'inhibition. Les symboles (+) illustrent des synapses excitatrices alors que les symboles (-) représentent des synapses inhibitrices. Figure adaptée de Morin et al. (1996) et Andersen (2007).

### 1.3. TRAITEMENT DE L'INFORMATION DANS L'HIPPOCAMPE

Historiquement, deux hypothèses ont été suggérées pour tenter d'expliquer comment l'information est codée et représentée dans le cerveau. La première suggère que le codage de l'information implique une multitude d'éléments computationnels individuels, les neurones, qui interagissent entre eux en transférant l'information par des signaux ponctuels, le long de leurs axones et via les synapses (Andersen 2007). La deuxième

hypothèse suggère plutôt que la représentation de l'information nécessiterait un mode de codage qui fait appel à l'action collective de plusieurs neurones et dont l'activité est reflétée par la décharge synchrone (Somogyi & Klausberger 2005 ; Andersen 2007). Récemment, plusieurs évidences laissent croire que le fonctionnement de l'hippocampe ferait appel à ces deux modes de représentation (Andersen 2007). Cependant, les liens précis entre le codage par des neurones uniques et les propriétés computationnelles de réseaux neuronaux restent encore méconnus (Buzsaki 2002). Dans la présente section, il sera question de mécanismes de traitement de l'information par l'hippocampe. Dans un premier temps, la transmission et la plasticité synaptiques seront brièvement abordées. Ensuite, le sujet des patrons neuronaux d'activité collective sera discuté et une attention particulière sera portée au rythme thêta.

### **1.3.1 TRANSMISSION ET PLASTICITE SYNAPTIQUE DANS L'HIPPOCAMPE**

#### ***1.3.1.1 Transmission synaptique***

La **synapse** est le point de contact fonctionnel qui permet la communication entre deux neurones. Le neurone présynaptique transmet l'information alors que le neurone postsynaptique la reçoit (Purves & Roucoux 1999 ; Kandel et al. 2000). Il existe deux types de synapses dans le système nerveux, la synapse électrique et la synapse chimique. La synapse électrique relie le neurone présynaptique au neurone postsynaptique par des canaux ioniques de type « gap-junction » qui permettent le passage passif du courant électrique. Dans le cas des synapses chimiques, qui sont majoritaires dans le SNC, les éléments présynaptique et postsynaptique sont séparés physiquement par la fente synaptique. La transmission du signal repose sur une séquence précise d'événements. L'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison présynaptique entraîne une dépolarisation membranaire qui permet l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage. L'élévation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire déclenche la libération de neurotransmetteurs par l'activation des mécanismes de fusion des vésicules synaptiques. Les molécules de neurotransmetteur libérées dans la fente synaptique se lient aux récepteurs postsynaptiques ionotropes ou métabotropes. Finalement, l'ouverture de conductances postsynaptiques reconvertit le signal chimique en signal électrique (Purves & Roucoux 1999 ; Kandel et al. 2000). Il existe une grande variété de neurotransmetteurs

mais on distingue deux catégories principales selon leur effet postsynaptique : (1) les neurotransmetteurs excitateurs (comme le glutamate et l'acétylcholine) et (2) les neurotransmetteurs inhibiteurs (comme le GABA et la glycine) (Purves & Roucoux 1999 ; Kandel et al. 2000).

### ***1.3.1.2 Plasticité synaptique***

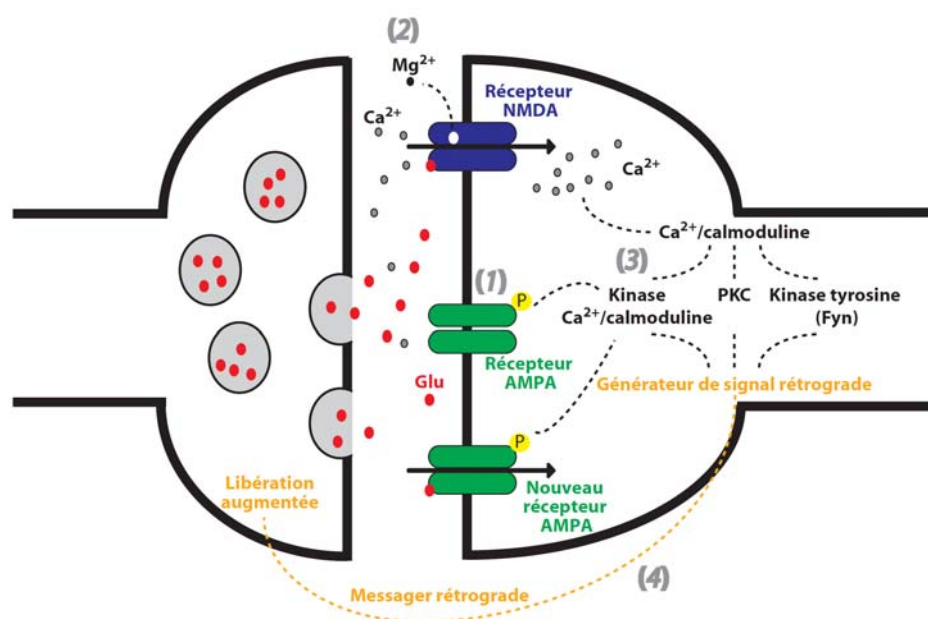
Les synapses ont des propriétés plastiques puisque leur efficacité de transmission peut être modifiée en fonction de certains patrons d'activité (Kandel et al. 2000 ; Nicoll & Malenka 1995). Certaines formes de plasticité synaptique induisent une augmentation de l'efficacité synaptique alors que d'autres la diminuent. De plus, ces changements peuvent être de courte durée ou à long terme (Purves & Roucoux 1999 ; Kandel et al. 2000). Plusieurs travaux ont suggéré que des changements à long terme au niveau de l'efficacité de transmission synaptique constitueraient un mécanisme cellulaire essentiel pour l'hippocampe, l'apprentissage et la mémoire (Bliss & Collingridge 1993; Martin et al. 2000). Pour cette raison, les caractéristiques de deux formes de plasticité synaptique à long terme, la **potentialisation à long terme** et la **dépression à long terme**, seront décrites.

#### *Potentialisation à long terme (PLT)*

La PLT est le renforcement prolongé de l'efficacité de transmission synaptique consécutive à certains types de stimulations répétées. Les travaux de Bliss et Lomo ont fourni la première description détaillée de la PLT (Bliss & Lomo 1973). Chez le lapin *in vivo*, ils démontrèrent que l'application d'un train de stimulations à haute fréquence (tétanisation) menait à un renforcement persistant de l'efficacité de transmission aux synapses formées par les terminaisons de la voie perforante sur les cellules granulaires du gyrus dentelé (Bliss & Lomo 1973). On distingue deux phases de PLT. La première, la phase précoce (« early-LTP »), est généralement induite par un seul train de stimulation. Elle dure de une à trois heures et nécessite la phosphorylation de protéines déjà existantes. La seconde, la phase tardive (« late-LTP »), nécessite plusieurs trains de stimulation à haute fréquence et est associée à la formation de nouvelles synapses grâce à la synthèse de nouvelles protéines (Bliss & Collingridge 1993 ; Kandel et al. 2000).



Des modèles *in vitro* ont été développés pour élucider les bases cellulaires et moléculaires de cette forme de la PLT (Purves & Roucoux 1999 ; Andersen 2007). Ce genre d'approche a permis de caractériser en détails une forme de PLT associative dépendante des récepteurs ionotropes glutamatergiques N-méthyl-D-aspartate (**NMDA**) qui se produit au niveau des synapses établies dans l'hippocampe par les terminaisons des voies perforante et des collatérales de Schaffer. Un train unique de stimulation induit la phase précoce de cette forme de PLT et engendre une dépolarisation membranaire postsynaptique grâce à l'activation de récepteurs ionotropes  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (**AMPA**). La dépolarisation postsynaptique permet la levée du blocage dépendant du voltage des récepteurs NMDA par le  $Mg^{2+}$ . Ce blocage étant levé, les récepteurs NMDA peuvent alors être activés par le glutamate et permettre l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule postsynaptique. Cet influx calcique déclenche les étapes menant à un renforcement durable de l'efficacité de la transmission via l'activation directe ou indirecte de protéines kinases. En effet, ces kinases permettent d'augmenter la conductance unitaire des récepteurs AMPA déjà présents en plus d'accroître l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA. De plus, l'action des kinases conduirait à une libération de neurotransmetteurs plus importante au niveau présynaptique par la synthèse d'un messager rétrograde qui pourrait activer la machinerie de libération présynaptique (**Fig. 5**) (Bliss & Collingridge 1993 ; Nicoll & Malenka 1995 ; Kandel et al. 2000).



**FIGURE 5. Phase précoce de la PLT associative hippocampique**

L'induction de la phase précoce de cette forme de PLT nécessite une dépolarisation membranaire postsynaptique, rendue possible grâce à l'activation de récepteurs AMPA (1) qui permet de lever le blocage des récepteurs NMDA par le  $Mg^{2+}$  (2). Le  $Ca^{2+}$  peut alors passer à travers les récepteurs NMDA. L'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire permet l'activation des protéines kinases  $Ca^{2+}$ /calmoduline, PKC et Fyn (3) qui permet l'induction de la PLT. De plus, la kinase  $Ca^{2+}$ /calmoduline phosphoryle (P) les récepteurs AMPA, ce qui augmente leur sensibilité au glutamate (Glu). Finalement, le neurone postsynaptique relâcherait un messager rétrograde (4) menant à une augmentation de la libération de neurotransmetteurs qui contribuerait aussi à la PLT. Figure adaptée de Nicoll & Malenka (1995) et Kandel et al. (2000).

Le mécanisme d'induction de la PLT associative hippocampique venant d'être décrit a été largement étudié. Toutefois, il ne faut pas négliger qu'il existe, à différentes synapses, d'autres types de PLT reposant sur des mécanismes d'induction variés. À titre d'exemple, aux synapses établies par les terminaisons des fibres moussues sur les cellules pyramidales de la région CA3, une PLT non associative peut être observée. L'induction de ce type de PLT est indépendante des récepteurs NMDA et repose plutôt sur l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans les terminaisons présynaptiques (Nicoll & Malenka 1995).

La téτανisation des afférences excitatrices peut engendrer différentes formes de plasticité dans les interneurons inhibiteurs hippocampiques, ce qui est susceptible d'avoir un impact sur l'activité des cellules pyramidales. Par exemple, une PLT associative indépendante des récepteurs NMDA est observée dans l'hippocampe, au niveau des synapses excitatrices sur les interneurons localisés dans le *stratum oriens* de la région CA1 (Perez et al. 2001). Dans ce cas, l'induction de la PLT nécessite l'activation de récepteurs glutamatergiques métabotropes mGluR1 (Perez et al. 2001). Puis, une autre forme de PLT a récemment été démontrée dans les interneurons de la même région et serait plutôt de nature non associative (Lamsa et al. 2007).

Tel que mentionné précédemment, la phase tardive de la PLT est déclenchée par des stimulations plus soutenues et dépend de la synthèse de nouvelles protéines (Kandel et al. 2000). Sur le plan moléculaire, le passage à la phase tardive devient possible grâce à l'activation soutenue des cascades intracellulaires enclenchées lors de la phase précoce. Cela engendre l'envoi d'un signal au noyau qui active la transcription. Les ARNm nouvellement synthétisés peuvent alors être traduits (dans le corps cellulaire ou au niveau dendritique) en protéines qui pourront contribuer au renforcement synaptique durable (Kandel et al. 2000).

#### *Dépression à long terme (DLT)*

La DLT est une forme de plasticité synaptique qui, contrairement à la PLT, entraîne une réduction durable de l'efficacité synaptique. La DLT est consécutive à certains types de stimulation à basse fréquence (Malenka & Bear 2004). De manière similaire à la PLT, différents types de DLT, avec des mécanismes moléculaires distincts, sont retrouvés. Par exemple, aux synapses hippocampiques formées par les collatérales de Schaffer sur les cellules pyramidales de la région CA1, une DLT dépendante des récepteurs NMDA a été caractérisée. En effet, l'activation de ces récepteurs permettrait une entrée postsynaptique de  $\text{Ca}^{2+}$  menant à l'activation de phosphatases qui contribueraient à la déphosphorylation de kinases importantes et de récepteurs AMPA (Kameyama et al. 1998; Hrabetova & Sacktor 2001). D'autre part, à certaines synapses hippocampiques et cérébelleuses, une autre forme de DLT dépend plutôt de l'activation de récepteurs métabotropes glutamatergiques (mGluR) du groupe 1 (Oliet et al. 1997; Jin et al. 2007). Finalement, il

est à noter que comme c'est le cas pour la PLT, il semble que la stabilité de l'expression à long-terme de la DLT nécessite la synthèse de nouvelles protéines (Kauderer & Kandel 2000; Sajikumar & Frey 2003).

### 1.3.2 PATRONS ÉLECTROENCÉPHALOGRAPHIQUES HIPPOCAMPIQUES

Une approche classique dans l'étude de la fonction de l'hippocampe est de corréler les patrons électriques d'activité neuronale avec des états comportementaux et/ou cognitifs. Dans les années 60, Vanderwolf a étudié des patrons électroencéphalographiques (EEG; représentant la somme de l'activité électrique de multiples neurones) enregistrés dans l'hippocampe en relation avec les comportements observés chez le rat (Vanderwolf 1969). Depuis ces travaux initiaux, un total de six patrons EEG hippocampiques ont été identifiés chez le rat : deux sont non rythmiques (activité **irrégulière de large amplitude** (ILA; « large irregular amplitude ») et activité **irrégulière de petite amplitude** (IPA; « small irregular amplitude »)) et quatre sont rythmiques (**thêta**, **bêta**, **gamma** et **ondulations**) (Andersen 2007). Les caractéristiques et les corrélats comportementaux de ces patrons EEG hippocampiques seront décrits dans la présente section.

#### 1.3.2.1 *Patrons EEG hippocampiques non rythmiques*

##### *Activité irrégulière de large amplitude (ILA)*

Le patron d'activité ILA (**Fig. 6**) est un des deux patrons EEG non rythmiques qu'il est possible d'enregistrer dans l'hippocampe de rat. Il est associé à des comportements qui ne modifient pas la localisation de l'animal (par exemple lorsque le rat est assis, qu'il mange, qu'il boit, etc.) et peut être observé durant le sommeil à ondes lentes (« slow wave sleep ») (Andersen 2007). Lors de l'activité ILA, de larges ondes pointues (« sharp waves »), accompagnées d'oscillations à hautes fréquences nommées ondulations (« ripples »), peuvent prendre place (Andersen 2007).



**FIGURE 6. Activité irrégulière de large amplitude (ILA)**

Enregistrement dans l'hippocampe de rat illustrant l'activité non rythmique ILA durant le sommeil à ondes lentes. Figure adaptée de Whishaw & Vanderwolf (1973).

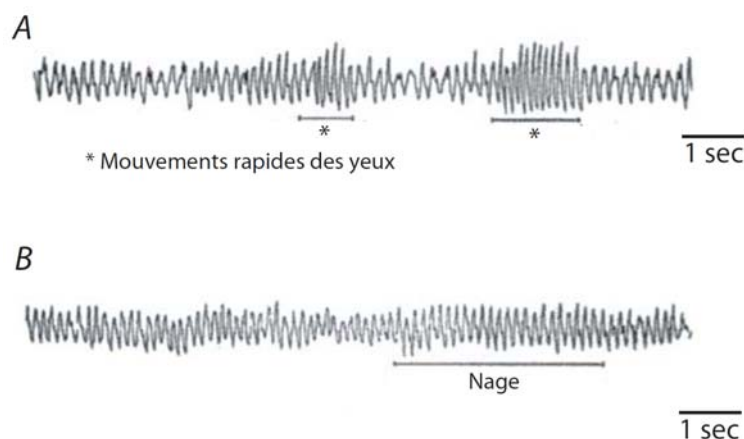
*Activité irrégulière de petite amplitude (IPA)*

Le second patron d'activité non rythmique hippocampique est l'activité IPA (Whishaw & Vanderwolf 1971). Ce patron est peu fréquent et survient chez le rat lorsqu'un mouvement est interrompu abruptement ou lorsqu'il y a transition d'un état de repos ou de sommeil à un état d'attention élevée (Whishaw & Vanderwolf 1971; Andersen 2007).

**1.3.2.2 Patrons EEG hippocampiques rythmiques**

*Rythme thêta (6-12 Hz)*

Le rythme hippocampique **thêta** (6-12 Hz ; **Fig. 7**) apparaît chez les rongeurs durant le sommeil paradoxal (« REM sleep »), l'exécution de mouvements volontaires ou exploratoires, l'apprentissage ainsi que la formation et le rappel de mémoires. Les oscillations gamma peuvent être observées durant le rythme thêta (Jung et Kurnmuller 1938; Vanderwolf 1969; Buzsaki 2002; Andersen 2007). Les caractéristiques et les mécanismes de génération des oscillations thêta hippocampiques seront abordés en plus grands détails dans la section suivante.



### FIGURE 7. Rythme thêta hippocampique

Enregistrements dans l'hippocampe de rat démontrant le patron d'activité collective oscillatoire thêta. *A*, Traces illustrant le rythme thêta durant le sommeil paradoxal. *B*, Activité thêta durant le mouvement. Figure adaptée de Whishaw & Vanderwolf (1973).

#### *Rythme bêta (12-20 Hz)*

Le rythme **bêta** (10-20 Hz) a largement été associé à des inputs olfactifs. Notamment, ce rythme peut être enregistré lorsque l'animal sent des odeurs associées à un prédateur (Andersen 2007). De plus, il a été suggéré que les oscillations bêta pourraient être importantes pour mettre en relation différentes populations neuronales (Leung 1992). Le rythme bêta peut être observé seul ou en combinaison avec les activités ILA ou IPA ou durant le rythme thêta (Andersen 2007).

#### *Rythme gamma (20-100 Hz)*

Le patron EGG **gamma** (20-100 Hz) peut être enregistré lorsque l'animal sent diverses odeurs (Andersen 2007). De plus, à partir d'études réalisées chez différentes espèces de mammifères, il a été suggéré que les oscillations gamma permettraient la liaison temporelle (« temporal binding ») de diverses régions néocorticales dont l'hippocampe. Une telle fonction permettrait des représentations complexes d'information (Singer 1999 ; Fries et al. 2007). Comme c'est le cas pour le rythme bêta, le patron gamma peut être observé seul ou en combinaison avec les activités ILA, ou IPA ou au cours du rythme thêta (Andersen 2007).

### *Ondulations (120-200 Hz)*

Des ondes pointues peuvent être observées durant l'activité ILA. Ces ondes pointues peuvent être le siège d'épisode d'oscillations à haute fréquence nommées **ondulations** (120 et 200 Hz) durant environ 100 ms (Buzsaki 1989 ; Somogyi & Klausberger 2005). Les ondulations apparaissent lors de comportements instinctifs de même que durant le sommeil et ont une amplitude maximale dans la couche pyramidale de la région CA1 (Buzsaki 1989) (Somogyi & Klausberger 2005). Il a été suggéré que ces ondulations pourraient constituer une forme de mise en reprise (« replay ») de l'information importante pour la consolidation de la mémoire (Buzsaki 1989) (Wilson & McNaughton 1994).

### **1.3.3 OSCILLATIONS THETA : ETAT « EN LIGNE » DE L'HIPPOCAMPE**

Depuis la découverte du rythme EEG thêta chez le lapin par Jung et Kornmuller en 1938, l'étude de ce patron oscillatoire et de ses corrélats comportementaux a représenté un chapitre majeur de la recherche en neuroscience comportementale et cognitive (Buzsaki 2005). Tel que mentionné précédemment, le rythme thêta consiste en des oscillations sinusoïdales proéminentes dans l'EEG à des fréquences entre 6 à 12 Hz qui ont fréquemment été associées à l'exploration de l'environnement et à l'apprentissage (Vinogradova 1995 ; (Konopacki 1998 ; Leung 1998 ; Buzsaki 2002). Chez le rongeur éveillé, les oscillations EEG thêta apparaissent principalement durant les mouvements de déplacement (marche, course, nage, sauts, mouvements exploratoires de la tête) ayant souvent été qualifiés de « volontaires », « exploratoires » ou « préparatoires » (Vanderwolf 1969) (Winson 1978 ; Bland 1986 ; Buzsaki 2002). Le rythme thêta peut aussi être observé lors du sommeil paradoxal et occasionnellement durant l'immobilité, lorsque l'animal est en état d'attention ou d'excitation (Buzsaki 2002 ; Andersen 2007). Il n'y a présentement pas de terme unique pour bien décrire tous les corrélats comportementaux des oscillations thêta de l'hippocampe. Par contre, Buzsaki réfère au rythme thêta comme étant l'état opérationnel ou « en ligne » de cette structure (Buzsaki 2002). Puis, bien qu'il existe toujours plusieurs questionnements concernant le rôle exact du rythme thêta hippocampique (Buzsaki 2005), l'expérimentation effectuée chez les rongeurs a permis de suggérer trois rôles pour ce patron EEG :

### *1. Mécanisme de synchronisation globale*

Le rythme thêta pourrait être un mode global de traitement de l'information capable d'organiser l'activité neuronale dans différentes régions de l'hippocampe. En effet, il a été montré que dans l'hippocampe, des neurones distants peuvent présenter des activités synchronisées avec le rythme EEG thêta, de manière cohérente (Bullock et al. 1990). Ainsi, deux cellules physiquement éloignées l'une de l'autre et présentant des patrons de décharge qui sont systématiquement reliés au cycle thêta local pourraient être mises en relation temporelle grâce au rythme thêta (Andersen 2007).

### *2. Horloge périodique régulant la décharge des potentiels d'action*

La relation entre la phase d'un cycle oscillatoire thêta et la décharge individuelle d'une cellule pyramidale de l'hippocampe n'est pas constante et peut varier d'un cycle à un autre. Lorsqu'un rat se déplace, une cellule pyramidale qui code pour de l'information spatiale (et possède un champ spatial ou « place field ») décharge des potentiels d'action à une fréquence légèrement plus élevée que celle du rythme EEG thêta concomitant. Ainsi, il s'ensuit une précession de phase de la décharge lors des cycles successifs (O'Keefe & Recce 1993). Donc, la variation temporelle entre la décharge des potentiels d'action dans un neurone et la phase du rythme thêta apporte de l'information au sujet de la localisation spatiale de l'animal (Andersen 2007). Ceci s'ajoute à l'information spatiale qui peut être contenue dans le taux de décharge neuronal (Huxter et al. 2003).

### *3. Contrôle temporel de l'induction de la PLT*

Il a été montré que la stimulation synaptique peut mener à différentes formes de plasticité synaptique selon la phase du rythme thêta. Effectivement, dans la région CA1 de l'hippocampe, une stimulation synaptique durant le sommet (« peak ») du rythme thêta induit une potentialisation synaptique alors qu'une stimulation pendant le creux (« trough ») du rythme thêta entraîne plutôt une dépression (Huerta & Lisman 1995 ; Hyman et al. 2003). Ainsi, en modulant l'induction de la plasticité, les oscillations thêta contrôleraient, par inférence, le stockage et le rappel des informations à partir de l'hippocampe (Kahana et al. 2001 ; Andersen 2007). Il a même été proposé que les différentes phases du rythme thêta de la région CA1 représenteraient des modes



d'opération différents : le sommet du rythme thêta constituerait la période durant laquelle l'information qui entre dans l'hippocampe (à partir du cortex entorhinal) est encodée tandis que le creux serait une période de rappel des informations de l'hippocampe (vers le cortex entorhinal) (Hasselmo 2005).

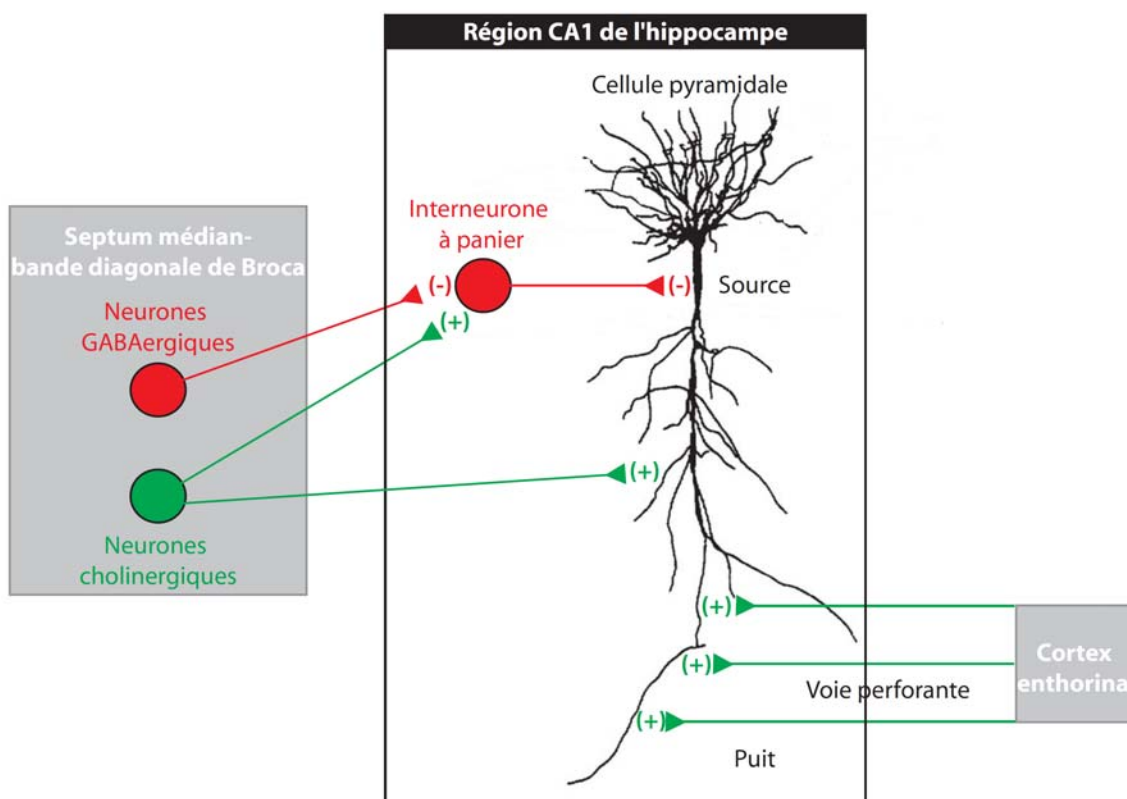
Pour terminer, il est pertinent de mentionner que les oscillations thêta ont été observées non seulement chez les rongeurs mais aussi chez une variété d'espèces animales (Buzsaki 2005) (Andersen 2007). Chez l'humain, il a récemment été démontré à l'aide d'enregistrements EEG et EEG intracrâniens (EEGi) que des patrons d'oscillations thêta peuvent être observés dans différentes régions du cerveau (Kahana et al. 2001 ; Raghavachari et al. 2001). Plus spécifiquement dans l'hippocampe, des oscillations EEG lentes (1-4 Hz) qui rappellent le rythme thêta décrit chez les rongeurs ont été observées lors du sommeil paradoxal (Bodizs et al. 2001 ; Cantero et al. 2003) et chez des sujets éveillés (Jacobs et al. 2007). Ces oscillations seraient analogues au rythme thêta hippocampique observé chez les rongeurs et seraient également importantes pour la navigation spatiale (Jacobs et Kahana 2010). Finalement, il est pertinent de mentionner que chez des sujets humains éveillés, un rythme néocortical thêta (entre 4 et 8 Hz) peut être enregistré et faciliterait l'apprentissage et l'exploration (Caplan et al. 2003). L'ensemble de ces observations laisse présager que l'étude du rythme thêta chez les rongeurs pourrait éventuellement permettre de mieux saisir les fondements de l'activité thêta observée chez l'humain.

## 1.4. GENERATION DU RYTHME THETA DANS L'HIPPOCAMPE

### 1.4.1 MODELE CLASSIQUE

Pour expliquer les mécanismes qui génèrent le rythme thêta dans l'hippocampe, un modèle qualifié de « classique » par Buzsaki (Buzsaki 2002) sert fréquemment de référence (**Fig. 7**). Le **septum médian** et la **bande diagonale de Broca (SM-BDB)** sont identifiés comme des générateurs cruciaux de rythme puisque des lésions ou l'inactivation du SM-BDB inhibent l'émergence du rythme thêta dans leurs cibles corticales (dont l'hippocampe) (Petsche et al. 1962 ; Mitchell et al. 1982 ; Buzsaki 2002). Selon le modèle classique, les oscillations thêta hippocampiques enregistrées en potentiels de champs extracellulaires

seraient dues à la sommation de potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSE) dendritiques et de potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) somatiques sur les cellules pyramidales de la région CA1. Les inputs excitateurs principaux proviendraient de la voie perforante (dipôle excitateur). Cette idée est supportée par le fait que les oscillations thêta exposent une amplitude maximale au niveau de la fissure hippocampique, ce qui suggère la contribution d'une excitation rythmique des dendrites distales des cellules pyramidales de la région CA1 par des afférences entorhinales. Des interneurones à panier de l'hippocampe générant une inhibition proactive seraient responsables des inputs inhibiteurs sur les cellules pyramidales (dipôle inhibiteur). Ces interneurones seraient soumis à la rythmicité des inputs excitateurs et inhibiteurs provenant du SM-BDB (Buzsaki 2002). Ce modèle considère l'interaction entre ces deux pôles générateurs de courants comme étant à la base du rythme thêta enregistré dans l'hippocampe (**Fig. 7**) (Buzsaki 2002).



**FIGURE 7. Modèle « classique » de génération du rythme thêta dans la région CA1 de l'hippocampe**

Schéma illustrant la vue « classique » des interactions neuronales qui seraient responsables de la génération du rythme thêta extracellulaire dans la région CA1 hippocampique. Figure adaptée de Morin et al. (1996) et Buzsaki (2002).

#### 1.4.2 AUTRES CONTRIBUTIONS A LA GENERATION DU RYTHME THETA

Des données suggèrent que la vision « classique » des mécanismes de génération du rythme thêta hippocampique serait incomplète. Par exemple, il a été observé que la relation entre la décharge de cellules pyramidales et le rythme EEG thêta peut varier de manière dynamique en fonction du comportement (O'Keefe & Recce 1993). Cela peut paraître contre-intuitif puisque selon le modèle, les oscillations thêta seraient principalement dues à la décharge synchronisée de ces mêmes cellules (Buzsaki 2002). Ensuite, plusieurs observations suggèrent qu'au moins une portion du mécanisme de génération du rythme thêta pourrait être attribuable aux propriétés intrinsèques du réseau neuronal de l'hippocampe :

Premièrement, le réseau neuronal hippocampique possède des oscillateurs intrinsèques qui pourraient contribuer à la génération du rythme thêta. En effet, il a été montré que l'activité rythmique de type thêta pouvait être générée à l'aide d'agonistes cholinergiques appliqués à des hippocampes isolés d'inputs extrinsèques (Konopacki et al. 1987). De plus, durant la rédaction de cette thèse, des travaux récents ont démontré l'existence d'oscillateurs thêta intrinsèques à la région CA1 (Goutagny et al.; sous presse).

Deuxièmement, il a été observé que des cellules pyramidales de l'hippocampe présentent des propriétés intrinsèques générant des patrons de décharge rythmique (Nunez et al. 1987) ou des oscillations de potentiel membranaire (OPM) dans le domaine de fréquences thêta (Leung & Yim 1991). Il est envisageable que l'apport de ces rythmes cellulaires intrinsèques soit aussi important pour la génération du rythme thêta que les apports extrinsèques décrits par le modèle classique.

Troisièmement, certaines propriétés des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe semblent avoir été sous-estimées par le modèle « classique » et des évidences récentes suggèrent que la contribution des interneurons locaux présenterait plusieurs facettes. Tout d'abord, des expériences effectuées chez le rat *in vivo* anesthésié ont démontré que différentes classes d'interneurones de la région CA1 déchargent à diverses phases du rythme EGG thêta (Klausberger et al. 2003 ; Klausberger et al. 2005 ; Klausberger 2009). Ces travaux laissent entrevoir des contributions différentielles à la génération du rythme thêta selon la classe d'interneurones considérée. En second lieu, certains interneurons locaux présentent des OPM intrinsèques dans le domaine de fréquences thêta qui sont modulées par l'activation de récepteurs cholinergiques (Chapman & Lacaille 1999a ; Chapman & Lacaille 1999b). Les OPM des interneurons pourraient soutenir l'inhibition rythmique des cellules pyramidales et contribuer à la génération du rythme thêta extracellulaire (cette notion sera exposée plus en détails ultérieurement). Ainsi, ces éléments remettent en question la section du modèle « classique » qui concerne la contribution des interneurons locaux.

En somme, le modèle « classique » de génération du rythme thêta extracellulaire met beaucoup d'emphasis sur les contributions extrinsèques provenant du SM-BDB et du

cortex entorhinal mais considère peu la grande diversité de propriétés intrinsèques à l'hippocampe. Plusieurs évidences récentes laissent présager que le rythme thêta repose, au moins en partie, sur des caractéristiques endogènes aux cellules pyramidales et aux interneurons du réseau hippocampique. De plus, puisque le rôle exact de ces interneurons dans la génération des oscillations thêta semble complexe et encore mal défini, il sera davantage question des cellules inhibitrices dans la section qui suit.

### 1.5. INTERNEURONES ET ACTIVITE RYTHMIQUE INTRINSEQUE

Plusieurs neurones de la formation hippocampique présentent des **oscillations de potentiel membranaire (OPM)** pouvant moduler la rythmicité globale des réseaux neuronaux dont ils font partie (Alonso & Llinas 1989 ; Leung & Yim 1991 ; Bilkey & Heinemann 1999 ; Chapman & Lacaille 1999b ; Glasgow & Chapman 2008). Dans la région CA1 de l'hippocampe, au moins deux populations d'interneurones démontrent ce type d'activité rythmique. Premièrement, les interneurons dont le corps cellulaire est localisé à la jonction des *strata lacunosum-moleculare* et *radiatum* (**interneurones LM/RAD**) (Lacaille & Schwartzkroin 1988b ; Lacaille & Schwartzkroin 1988a ; Williams et al. 1994 ; Bertrand & Lacaille 2001) démontrent des OPM dans le domaine de fréquences thêta (Chapman & Lacaille 1999b) et correspondent aux cellules des classes 7, 8 et 9 de la classification de Somogyi et Klausberger décrite précédemment à la section 1.2.3.3 (Somogyi & Klausberger 2005). Deuxièmement, les interneurons dont le corps cellulaire est localisé dans le *stratum oriens* présentent des OPM gamma (Chapman & Lacaille 1999b) et correspondent principalement aux cellules des classes 6, 11 et 12 de la classification de Somogyi et Klausberger (Somogyi & Klausberger 2005). Ainsi, dans la région CA1 les interneurons LM/RAD et ceux du *stratum oriens* pourraient respectivement contribuer à la génération des rythmes thêta et gamma (Chapman & Lacaille 1999b).

### 1.5.1 ACTIVITE OSCILLATOIRE INTRINSEQUE DANS LES INTERNEURONES LM/RAD

#### 1.5.1.1 *Caractéristiques des OPM des interneurones LM/RAD*

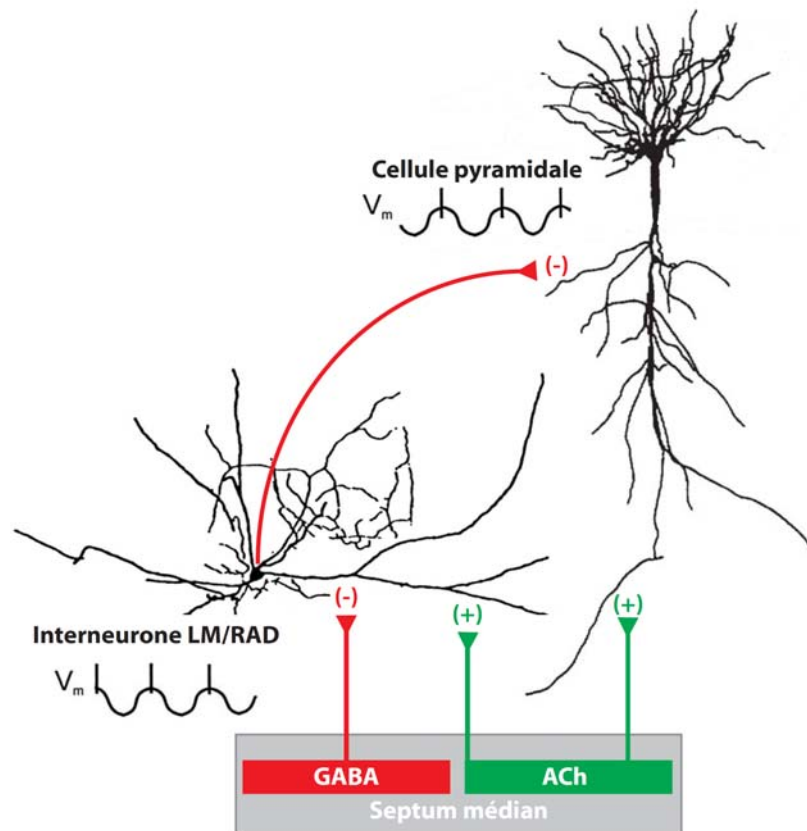
Des enregistrements de « patch-clamp » en configuration cellule entière, en mode courant imposé, ont permis de caractériser les OPM dans les interneurones LM/RAD de la région CA1 de l'hippocampe. Effectivement, il a été observé qu'elles sont dépendantes du voltage et apparentes sous le seuil des potentiels d'action (Williams et al. 1994 ; Chapman & Lacaille 1999b). À 32°C, en dépolarisant les interneurones près du seuil des potentiels d'action, les OPM enregistrées sont dans le domaine de fréquences thêta (Chapman & Lacaille 1999b). À température ambiante (22°C), des OPM sont toujours retrouvées mais à des fréquences légèrement plus lentes (autour de 2 Hz). La nature intrinsèque des OPM des interneurones LM/RAD a été démontrée par le fait que les oscillations sont observables malgré l'application de bloqueurs de transmission synaptique rapide glutamatergique et gabaergique (Chapman & Lacaille 1999b).

#### 1.5.1.2 *OPM des interneurones et génération du rythme thêta*

Il est intéressant de noter que les interneurones LM/RAD reçoivent des inputs cholinergiques du septum médian (Leranth & Frotscher 1987), cette structure qui, comme mentionné précédemment, contribuerait à la génération du rythme thêta hippocampique (Buzsaki 2002). *In vitro*, l'apport de ces inputs cholinergiques peut être simulé en appliquant l'agoniste cholinergique carbachol à des tranches d'hippocampe aiguës. Au potentiel de repos membranaire, le carbachol mène à une dépolarisation et induit des OPM soutenant la décharge rythmique dans les interneurones LM/RAD (Chapman & Lacaille 1999a). La dépolarisation induite par le carbachol est due à un effet cholinergique direct sur les interneurones puisque l'application de bloqueurs de transmission glutamatergique et gabaergique rapide ne l'empêche pas (Chapman & Lacaille 1999a). Plus précisément, l'activation de récepteurs cholinergiques muscariniques est responsable de cette dépolarisation (mACh) (Chapman & Lacaille 1999a). D'autre part, des stimulations minimales dans les interneurones LM/RAD induisent des PPSI dans les cellules pyramidales de la région CA1 qui sont suivies de dépolarisations par rebond menant à la décharge de potentiels d'action (Chapman & Lacaille 1999a). En particulier, des trains de

stimulations minimales à 3 Hz dans les interneurones LM/RAD engendrent une succession de PPSI et potentiels d'action par rebond dans les cellules pyramidales (la décharge des potentiels d'action se produisant avec une relation de phase de  $177^\circ$  relativement aux stimulations minimales) (Chapman & Lacaille 1999a). Ainsi, ces données expérimentales suggèrent fortement que l'activation de récepteurs mACh sur les interneurones LM/RAD, permettant l'apparition d'OPM et soutenant la décharge rythmique, pourrait contribuer à fournir une inhibition rythmique qui régulerait l'activité thêta synchrone de plusieurs cellules pyramidales de la région CA1.

Une telle idée peut s'intégrer dans un modèle de génération du rythme thêta hippocampique dans lequel les inputs septaux cholinergiques et gabaergiques joueraient des rôles importants (**Fig. 8**) (Chapman & Lacaille 1999a). En effet, les cellules pyramidales de la région CA1 reçoivent des inputs cholinergiques excitateurs provenant du septum médian tandis que les interneurones LM/RAD reçoivent à la fois des inputs excitateurs cholinergiques et inhibiteurs gabaergiques du septum médian (Leranth & Frotscher 1987 ; Freund & Antal 1988). Les afférences cholinergiques septales pourraient dépolariser les interneurones LM/RAD et induire des OPM pouvant soutenir la décharge rythmique. Il en résulterait des PPSI rythmiques sur les cellules pyramidales (au niveau dendritique puisque les interneurones LM/RAD établissent des contacts synaptiques sur les dendrites distales des cellules pyramidales menant à leur inhibition via l'activation de récepteurs GABA<sub>A</sub> (Bertrand & Lacaille 2001)). Les PPSI suivis de dépolarisations par rebond menant à la décharge de potentiels d'action réguleraient la décharge rythmique dans les cellules pyramidales qui serait déphasée de  $180^\circ$  par rapport à celle des interneurones. Puis, comme chaque interneurone LM/RAD établit des contacts synaptiques sur plusieurs cellules pyramidales, la décharge rythmique d'une seule de ces cellules pourrait synchroniser l'activité thêta de plusieurs cellules pyramidales. Finalement, l'activité oscillatoire thêta des interneurones LM/RAD pourrait à son tour être contrôlée par les inputs gabaergiques sur ces cellules, en provenance du septum médian (**Fig. 8**) (Chapman & Lacaille 1999a).



### FIGURE 8. Interneurones LM/RAD et activité thêta

Modèle de la contribution des interneurones LM/RAD dans le contrôle de la décharge thêta des cellules pyramidales, dans la région CA1 de l'hippocampe. Figure adaptée de Morin et al. (1996) et Chapman & Lacaille (1999a).

### 1.5.2 MECANISMES IONIQUES DE GENERATION DES OPM

À l'aide d'une approche pharmacologique, il a été démontré que des interactions entre des conductances  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont à l'origine des OPM dans les interneurones LM/RAD (Chapman & Lacaille 1999b). Plus précisément, l'utilisation de différents bloqueurs de courants ioniques, présentant divers degrés de spécificité, a permis de révéler que : (1) certains courants sont importants pour la génération des OPM des interneurones, (2) d'autres pourraient être potentiellement impliqués et (3) certains ne sont pas nécessaires.



### ***1.5.2.1 OPM dans les interneurones et courants $\text{Ca}^{2+}$ , $I_h$ et $\text{Na}^+$***

Il a été observé que les OPM dans les interneurones sont indépendantes des conductances  $\text{Ca}^{2+}$  puisqu'elles peuvent être observée en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  ou lorsque le  $\text{Cd}^{2+}$  (un bloqueur de canaux  $\text{Ca}^{2+}$ ) est appliqué. De plus, il semble que le courant cationique activé par l'hyperpolarisation ( $I_h$ ) ne soit pas nécessaire pour la génération de ces OPM puisque le  $\text{Cs}^+$  extracellulaire (un bloqueur du courant  $I_h$ ) ne les inhibe pas (Chapman & Lacaille 1999b). Par contre, des courants  $\text{Na}^+$  sont critiques pour la génération des OPM dans les interneurones puisque les oscillations sont fortement inhibées par la tetrodotoxine (TTX), un bloqueur de courants  $\text{Na}^+$  dépendants du voltage (Chapman & Lacaille 1999b).

### ***1.5.2.2 OPM dans les interneurones et courants $\text{K}^+$***

Des conductances potassiques sont aussi importantes pour la génération des OPM dans les interneurones mais le profil pharmacologique concernant leur implication est plus complexe. Tout d'abord, il faut mentionner que les OPM dans les interneurones LM/RAD sont insensibles à l'application extracellulaire de tetraethylammonium (TEA ; un bloqueur des courants  $\text{K}^+$  à rectification lente) (Chapman & Lacaille 1999b). Toutefois, les oscillations sont inhibées par le  $\text{Ba}^{2+}$  (un bloqueur de conductances  $\text{K}^+$  dépendantes du voltage) ainsi que par la 4-aminopyridine (4-AP ; un inhibiteur de plusieurs courants  $\text{K}^+$ ) (Chapman & Lacaille 1999b). Ce profil pharmacologique suggère que les courants de type A ( $I_A$ ) ou  $\text{K}^+$  sensibles à la dendrotoxine ( $I_D$ ) pourraient être impliqués dans la génération de cette activité oscillatoire puisqu'ils sont tous deux sensibles aux  $\text{Ba}^{2+}$  et à la 4-AP et résistants au TEA en plus de s'activer, comme les OPM, à des potentiels sous le seuil des potentiels d'actions (Rudy 1988 ; Hurst et al. 1995 ; Locke & Nerbonne 1997 ; Coetzee et al. 1999 ; Shi et al. 2000).

### ***1.5.2.3 Relations avec d'autres mécanismes de génération d'activité rythmique***

La génération des OPM dans les interneurones LM/RAD hippocampiques reposent ainsi sur des interactions entre des courants  $\text{Na}^+$  dépendants du voltage et les courants  $\text{K}^+$   $I_A$  et/ou  $I_D$ , en plus d'être indépendants des courants  $\text{Ca}^{2+}$ , du courant cationique  $I_h$  et des courant  $\text{K}^+$  sensibles au TEA. Ceci représente un mécanisme qui démontre des similitudes mais aussi des différences avec d'autres patrons de génération d'activité rythmique

neuronale. Par exemple, dans les cellules stellaires de la couche II du cortex entorhinal, des interactions entre le courant  $\text{Na}^+$  persistant ( $I_{\text{NaP}}$ ) et le courant cationique activé par l'hyperpolarisation ( $I_h$ ) sont à la base d'OPM (Alonso & Llinas 1989) (Klink & Alonso 1993 ; Dickson et al. 2000). Puis, dans la région CA1 de l'hippocampe, les cellules pyramidales exhibent des OPM dépendantes de conductances  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dépendantes du voltage (Leung & Yim 1991). Ces mêmes cellules pyramidales expriment aussi des états de résonance dans le domaine thêta qui sont générés par les courants  $I_{\text{NaP}}$ ,  $I_h$  et  $\text{K}^+$  sensibles à la muscarine ( $I_M$ ) (Hu et al. 2002). La résonance est l'habileté de répondre à des stimulations à une fréquence préférée et serait reliée aux propriétés oscillatoires des neurones (Hutcheon & Yarom 2000). Comme dans les interneurones LM/RAD, ces mécanismes ioniques sont indépendants des courants  $\text{Ca}^{2+}$  et contrastent avec ceux à la base de la décharge rythmique retrouvée chez des neurones thalamiques et hypothalamiques qui nécessitent l'apport des courants  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{K}^+$  activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Jahnsen & Llinas 1984 ; Alonso & Llinas 1992).

Puisque plusieurs conductances ioniques semblent impliquées dans la génération des OPM et le contrôle de l'excitabilité neuronale dans les interneurones hippocampiques, un survol des principaux canaux ioniques neuronaux sera effectué dans la prochaine section. Ensuite, une attention particulière sera portée au courant potassique  $I_A$  qui semble important pour la génération des OPM dans les interneurones LM/RAD.

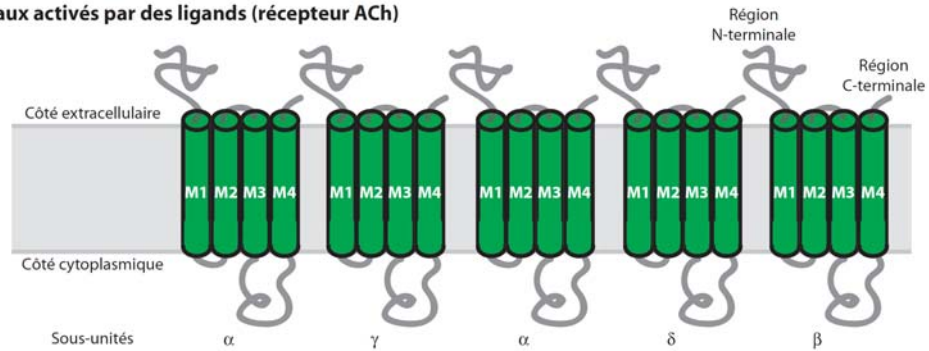
## **1.6. CANAUX IONIQUES**

### **1.6.1 CLASSES DE CANAUX IONIQUES**

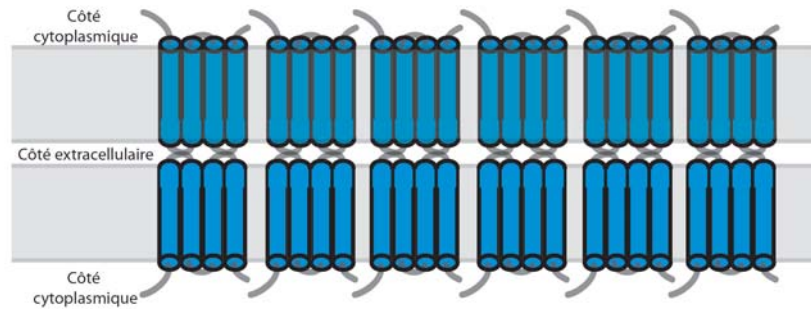
Le passage d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  à travers des canaux ioniques sous-tend l'excitabilité et la signalisation électrique du système nerveux (Hille 2001). Les canaux ioniques sont des protéines formant des pores aqueux qui franchissent la membrane plasmique. Ils permettent le passage d'ions spécifiques en réponse à des stimuli variés (Kandel et al. 2000 ; Hille 2001).

Les premiers enregistrements de courants ioniques à partir de cellules excitables ont mené à une nomenclature basée sur les propriétés biophysiques et pharmacologiques des courants ioniques. Il était alors présumé qu'un groupe particulier de canaux devait être à la base des différents types de courants enregistrés (Hille 2001). C'est ainsi que les enregistrements classiques de courants ioniques de l'axone géant de calmar, par Hodgkin et Huxley, ont conduit à l'identification de trois conductances : sodique, potassique et de fuite (Hodgkin & Huxley 1952). Par la suite, le développement de la biologie moléculaire et des techniques de clonage, de mutagenèse dirigée et d'expression de protéines en système hétérologue a permis d'identifier et de caractériser les gènes des grandes classes (ou superfamilles) de canaux ioniques (Hille 2001 ; Purves & Williams 2001). Plusieurs de ces gènes contiennent des sites d'épissage alternatif et des modifications post-traductionnels peuvent avoir lieu. En conséquence, il existe une diversité de canaux ioniques permettant aux différentes populations neuronales d'exhiber des caractéristiques particulières (Hille 2001 ; Purves & Williams 2001). Les canaux ioniques sont divisés en trois grandes classes (Kandel et al. 2000) : les canaux activés par des ligands, les canaux de type « gap-junction » et les canaux dépendants du voltage.

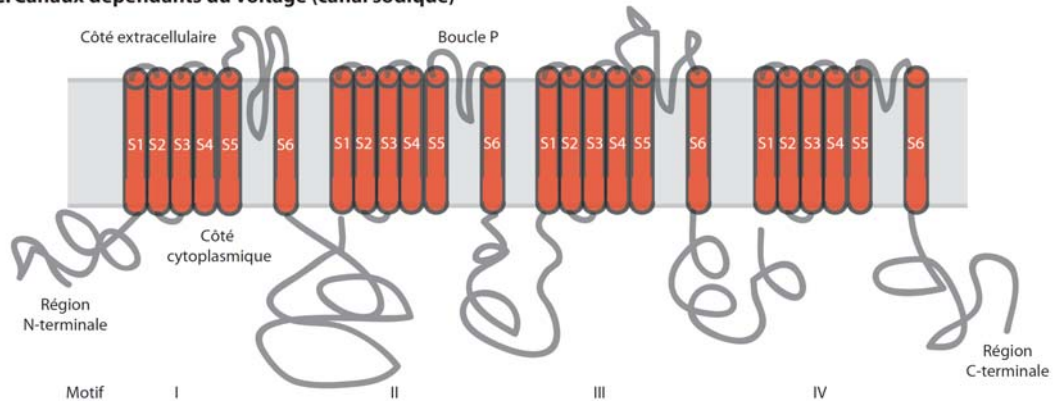
**A. Canaux activés par des ligands (récepteur ACh)**



**B. Canaux "gap-junction"**



**C. Canaux dépendants du voltage (canal sodique)**



**FIGURE 9. Exemples de membres des trois grandes classes de canaux ioniques**

(A) Certains membres de la classe des canaux ioniques activés par un ligand, comme le récepteur cholinergique (ACh) nicotinique, présentent cinq sous-unités possédant chacune quatre domaines transmembranaires (M1-M4). (B) Les canaux de la classe « gap-junction » sont formés d'hémicanaux présents dans les membranes pré- et postsynaptiques qui s'associent dans l'espace extracellulaire entre les deux cellules. (C) Dans la classe des canaux dépendants du voltage, la sous-unité  $\alpha$  du canal  $\text{Na}^+$  est formée d'une chaîne polypeptidique unique contenant quatre motifs de base (I-IV) de six domaines transmembranaires (S1-S6) et une région boucle P. Figure adaptée de Kandel et al. (2000).

*(A) Les canaux ioniques activés par des ligands*

Les canaux ioniques activés par des ligands sont aussi appelés récepteurs-canaux ou canaux ionotropes. Chaque famille de cette classe de canaux présente une sélectivité ionique caractéristique et une spécificité pour un ligand. Ces canaux sont des hétéromères constitués de trois (trimères ; famille des récepteurs-canaux P2X), quatre (tétramères ; récepteurs-canaux NMDA, AMPA ou kainate) ou cinq sous-unités (pentamères ; récepteurs-canaux ACh nicotiniques, sérotoninergiques 5-HT<sub>3</sub>, GABA<sub>A</sub>, Glycine ou ZAC) (**Fig. 9**) (Hille 2001 ; Collingridge et al. 2009). Les canaux ioniques de cette classe participent grandement à la neurotransmission rapide, excitatrice et inhibitrice, qui a lieu au niveau des synapses chimiques (Kandel et al. 2000 ; Purves & Williams 2001).

*(B) Les canaux « gap-junction »*

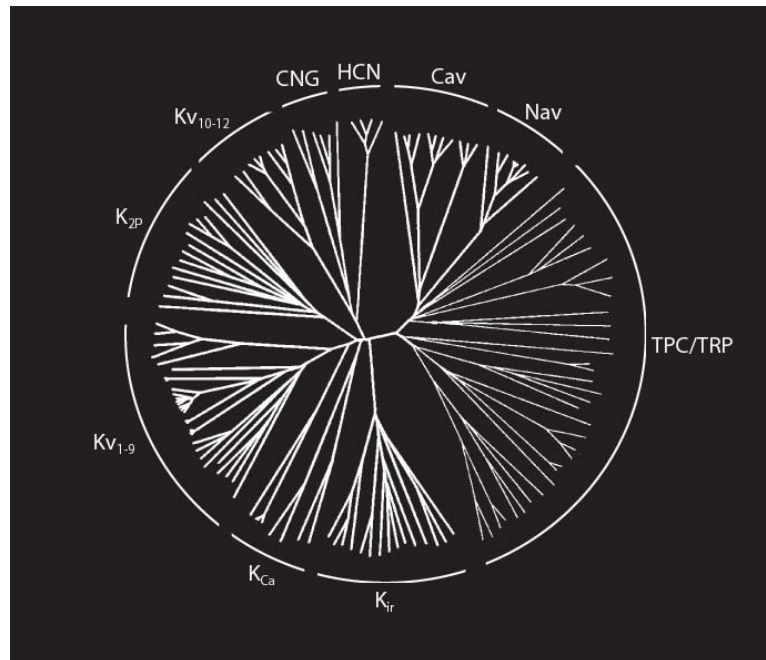
Cette classe comporte des canaux spécialisés qui relient le cytoplasme de deux cellules et sont impliqués dans la transmission du signal par les synapses électriques. Chaque cellule fournit six connexines qui forment un hémicanal (parfois appelé connexon) qui peut se joindre à un hémicanal de la cellule voisine. Le résultat est un canal « gap-junction » composé de 12 sous-unités, chacune possédant 4 segments transmembranaires (**Fig. 9**) (Kandel et al. 2000 ; Hille 2001).

*(C) Les canaux dépendants du voltage*

L'ouverture et la fermeture des canaux de cette classe sont induites par les changements de potentiel membranaire (dépolarisation ou hyperpolarisation). Ils présentent des sélectivités ioniques diverses ainsi qu'un grand éventail de propriétés fonctionnelles (Kandel et al. 2000 ; Hille 2001). Les canaux dépendants du voltage sous-tendent le potentiel membranaire, ils contribuent à la génération et à la propagation des potentiels d'action (contribuant ainsi à la transmission rapide de l'information dans le système nerveux) et ils régulent l'excitabilité générale et les patrons de décharge dans les neurones (Kandel et al. 2000 ; Hille 2001 ; Yu et al. 2005). Une récente nomenclature regroupe les canaux dépendants du voltage en sept sous-familles (**Fig.10**) (Yu et al. 2005):

- (1) Les canaux sodiques et calciques Nav et Cav.
- (2) Les canaux potassiques Kv<sub>1-9</sub>
- (3) Les canaux potassiques activés par le Ca<sup>2+</sup> K<sub>Ca</sub>

- (4) Les canaux potassiques à rectification entrante  $K_{ir}$
- (5) Les canaux potassiques à deux pores  $K_{2p}$
- (6) Les canaux potassiques  $Kv_{10-12}$ , les canaux activés par les nucléotides CNG et les canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides HCN
- (7) Les canaux à 2 pores TPC et les canaux récepteurs transitoires TRP



**FIGURE 10. La superfamille des canaux ioniques dépendants du voltage**

Représentation de la diversité des groupes de gènes codant pour des protéines de la superfamille des canaux ioniques dépendants du voltage et de leur relation basée sur la ressemblance des séquences d'acides aminés des régions formant le pore des canaux. Figure adaptée de Yu et al. (2005).

Sur le plan structurel, la région du pore des canaux de cette superfamille est formée par de longues chaînes peptidiques uniques  $\alpha$  ou par l'assemblage de plusieurs sous-unités protéiques  $\alpha$  (**Fig. 9**). Typiquement, les sous-unités  $\alpha$  ou les motifs de base des longs polypeptides  $\alpha$ , sont constitués de six domaines transmembranaires (S1-S6). Les segments S5-S6 sont connectés par une région extracellulaire nommée boucle P (« P-Loop ») qui forme le filtre de sélectivité (**Fig. 9**) (Kandel et al. 2000 ; Swartz 2004). Certaines exceptions existent comme par exemple dans les groupes des canaux  $K_{ir}$  ou  $K_{2p}$  chez lesquels des sous-unités  $\alpha$  à 2 ou 4 domaines transmembranaires sont retrouvées (Swartz

2004 ; Buckingham et al. 2005). L'énergie nécessaire au changement de conformation qui permet l'ouverture des canaux est fournie par le mouvement de régions chargées dans les sous-unités ou motifs de base des canaux, à travers le champ électrique membranaire (Kandel et al. 2000).

Dans cette superfamille de canaux, la famille des canaux  $K^+$  dépendants du voltage est la plus diverse. Plus de 100 gènes codent pour ce type de canaux ioniques, ce qui permet une importante diversité de conductances potassiques (Purves & Williams 2001). Parmi celles-ci, une conductance  $K^+$  aux propriétés notoires a suscité l'intérêt des chercheurs depuis maintenant plusieurs années : **le courant  $I_A$** . Ces propriétés et les rôles associés à ce courant seront décrits dans la section qui suit.

## 1.7. COURANT $I_A$ : PROPRIETES, ROLES ET BASES MOLECULAIRES

### 1.7.1 PROPRIETES ET ROLES CONNUS DU COURANT $I_A$

#### 1.7.1.1 *Propriétés du courant $I_A$*

Un courant  $K^+$  dépendant du voltage et s'inactivant rapidement (donc transitoire) a été observé pour la première fois par Hagiwara et collaborateurs (Hagiwara et al. 1961), lors d'enregistrements de neurones chez un mollusque. Connor et Stevens (1971b) utilisèrent pour la première fois l'appellation  $I(A)$  pour référer à ce type de courant  $K^+$  transitoire. Plusieurs appellations sont utilisées (courant de type A, courant A,  $I_{SA}$  et  $I_A$ ) pour référer à des courants  $K^+$  neuronaux dépendants du voltage qui possèdent les propriétés suivantes : (1) une activation rapide à des potentiels membranaires sous le seuil des potentiels d'action, (2) un développement rapide de l'inactivation et (3) une récupération rapide de l'inactivation à des potentiels hyperpolarisés (Rudy 1988) (Fan & Wong 1996) (Hille 2001; Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004). Ces caractéristiques particulières permettent au courant  $I_A$  de jouer des rôles physiologiques importants dans différentes populations neuronales. Un courant  $K^+$  possédant ces propriétés est retrouvé dans des cellules cardiaques et porte l'appellation  $I_{to}$  (pour « transient outward current ») (Patel & Campbell 2005).

### ***1.7.1.2 Courant $I_A$ et potentiels d'action***

Déjà dans les années 1970, les travaux de Connor et Stevens effectués sur des neurones de gastropodes suggéraient que le courant  $I_A$  régule l'intervalle de temps entre les potentiels d'action (« interspike interval » ou ISI) lors de la décharge répétitive de potentiels d'action (Connor & Stevens 1971a). Des évidences récentes supportent cette hypothèse en démontrant que l'inhibition spécifique du courant  $I_A$  à l'aide d'outils moléculaires, dans des neurones du SNC, modifie les propriétés de décharge répétitive (Shibata et al. 2000 ; Malin & Nerbonne 2001). Puis, en plus d'avoir été associé au contrôle de la décharge répétitive de potentiels d'action, il a été montré que le courant  $I_A$  module les propriétés du potentiel d'action individuel (durée, amplitude, etc.) et contrôle la latence du premier potentiel d'action lors d'une injection soutenue de courant dépolarisant (Zhang & McBain 1995a ; Shibata et al. 2000 ; Malin & Nerbonne 2001). Ainsi, le courant  $I_A$  neuronal peut moduler les propriétés et la décharge rythmique des potentiels d'action.

### ***1.7.1.3 Contribution du courant $I_A$ à l'intégration de l'information***

Les potentiels d'action ont la capacité de se propager non seulement de manière orthodromique le long de l'axone, mais aussi de façon rétrograde dans les dendrites (potentiels d'action rétrogrades ou « back propagating action potentials ») (Johnston et al. 2003). Cette propagation rétrograde est soutenue et modulée par des canaux ioniques dépendants du voltage localisés le long des dendrites. Dans les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe, il existe une densité de canaux  $I_A$  qui est plus importante dans les dendrites distales que proximales, ce qui permet une régulation différentielle de la propagation rétrograde des potentiels d'action (Hoffman et al. 1997). Lorsque des inputs synaptiques excitateurs coïncident avec la décharge de potentiels d'action rétrogrades dendritiques, l'induction de phénomènes tels la PLT et la DLT peut être facilitée (Johnston et al. 2003). L'expression de canaux  $I_A$  dendritiques est donc déterminante pour les phénomènes d'intégration et de plasticité postsynaptique (Johnston et al. 2003).

Également, dans les cellules pyramidales hippocampiques, le courant  $I_A$  joue un rôle dans l'intégration de l'information transmise le long de l'axone (Debanne et al. 1997). En effet,



il a été observé qu'une hyperpolarisation transitoire, permettant de lever l'inactivation d'une conductance  $I_A$ , empêche la propagation d'un potentiel d'action subséquent le long de l'axone. Ainsi, il a été suggéré que le maintien dans un état inactivé des canaux  $I_A$  localisés au niveau de la membrane axonale proximale permettrait la propagation efficace des potentiels d'action le long des fibres nerveuses (Debanne et al. 1997). Pour récapituler, le courant  $I_A$  peut contribuer à la fois à l'intégration des informations synaptiques au niveau dendritique et à la transmission d'information le long de l'axone.

## 1.7.2 BASES MOLECULAIRES DU COURANT $I_A$ SOMATODENDRITIQUE

### 1.7.2.1 Les canaux $Kv4$ comme candidats potentiels

Des approches utilisant la biologie moléculaire et la génétique ont permis d'identifier 4 sous-familles de gènes codant pour des canaux  $K^+$  dépendants du voltage chez la drosophile : *Shaker*, *Shab*, *Shaw* et *Shal*. Ces sous-familles sont conservées dans le règne animal et sont maintenant principalement désignées par les appellations  $Kv1$  (*Shaker*),  $Kv2$  (*Shab*),  $Kv3$  (*Shaw*) et  $Kv4$  (*Shal*) (Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004). Des études en système recombinant ont démontré que l'expression de gènes des sous-familles  $Kv1$ ,  $Kv3$  et  $Kv4$  (plus précisément,  $Kv1.4$ ,  $Kv3.3$ ,  $Kv3.4$ ,  $Kv4.1$ ,  $Kv4.2$  et  $Kv4.3$ ) mène à l'expression de courants  $K^+$  transitoires similaires au courant  $I_A$  des neurones (Song 2002). De plus, l'expression de  $Kv1.1$ ,  $Kv1.2$  et  $Kv1.5$  sous-tend généralement des courants  $K^+$  à inactivation lente mais lorsque exprimés avec les protéines accessoires  $Kv\beta1$  et  $Kv\beta3$ , il en résulte des courants transitoires à inactivation rapide (Robertson 1997 ; Jerng et al. 2004a). Bien que des canaux  $Kv1$ ,  $Kv3$  et  $Kv4$  peuvent être à la base de courants  $K^+$  transitoires en système d'expression hétérologue (Song 2002 ; Jerng et al. 2004a), plusieurs résultats suggèrent que les membres de la sous-famille  $Kv4$  ( $Kv4.1$ ,  $Kv4.2$  et  $Kv4.3$ ) forment la majorité des canaux qui sous-tendent le courant  $I_A$  somatodendritique des neurones :

- (1) Les courants  $K^+$  transitoires engendrés par l'expression hétérologue de sous-unités  $Kv4$  présentent des propriétés pharmacologiques qui rappellent celles des courants  $I_A$  neuronaux natifs. En effet, ils sont résistants à l'application d'une forte

concentration de TEA, sensibles à des concentrations millimolaires de 4-AP et l'ajout de  $\text{Cd}^{2+}$  extracellulaire produit le déplacement des courbes d'activation et d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés (Coetzee et al. 1999 ; Jerng et al. 2004a)

- (2) Des travaux ont révélé que chez les neurones de l'hippocampe, les canaux Kv4 se localisent dans le compartiment somatodendritique alors que les protéines Kv1 sont plutôt retrouvées au niveau axonal ou des terminaisons nerveuses (Sheng et al. 1992). Rivera et collaborateurs (2003) ont identifié un motif conservé de 16 acides aminés riche en dileucines dans la région C-terminale de sous-unités Kv4 qui semble responsable du ciblage de ces protéines au soma et dendrites des neurones. D'ailleurs, l'intégration de ce motif à des protéines Kv1 est suffisante pour altérer leur ciblage axonal et les mener plutôt au compartiment somatodendritique.
- (3) Chez la souris, au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire en tranches aiguës, une forte corrélation existe entre le niveau d'expression de l'ARNm de la sous-unité Kv4.3 et l'amplitude du courant  $I_A$  (Liss et al. 2001).
- (4) L'inhibition du courant  $I_A$  induite par la surexpression d'une sous-unité Kv4 mutée, agissant comme dominant négatif, a permis de démontrer que les sous-unités Kv4 contribuent au courant  $I_A$  natif dans les cellules granulaires du cervelet (Shibata et al. 2000), les neurones sympathiques du ganglion cervical supérieur (Malin & Nerbonne 2001) et dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Kim et al. 2005).

#### ***1.7.2.2 Propriétés des canaux Kv4 et distribution dans l'hippocampe***

**Structure des canaux Kv4.** Les canaux Kv4 sont des macromolécules formées de 4 sous-unités  $\alpha$  de la même sous-famille (homomères ou hétéromères) (Birnbaum et al. 2004). Chacune des sous-unités du tétramère possède une région intracellulaire N-terminale, une portion transmembranaire à 6 segments (S1-S6) et une région intracellulaire C-terminale (**Fig. 11**) (Birnbaum et al. 2004 ; Vacher et al. 2008). La région centrale S1-S6 est responsable de la formation du pore, de la sélectivité potassique et du mécanisme

d'ouverture en réponse au voltage (Jerng et al. 2004a). Les segments S5-S6 et la boucle P forment la voie de perméation sélective des ions  $K^+$  le long de son gradient électrochimique (Birnbaum et al. 2004). Des évidences suggèrent que le segment S4 serait impliqué dans la sensibilité au voltage et que les acides aminés positivement chargés qu'il contient se déplaceraient à travers le champ électrique pour permettre l'ouverture du canal (Birnbaum et al. 2004 ; Jerng et al. 2004a). En contraste avec la région centrale S1-S6 transmembranaire qui est hautement conservée, les régions N- et C- terminales intracellulaires sont plus variables (Jerng et al. 2004a).

**Tétramérisation des sous-unités Kv4.** Les sous-unités principales de la famille de canaux Kv comportent des régions d'environ 100 acides aminés, localisées dans le domaine N-terminal, qui sont importantes pour la tétramérisation. Ces régions sont nommées **domaines T1** et déterminent la spécificité de l'assemblage des sous-unités à l'intérieur d'une sous-famille (Li et al. 1992). Des domaines T1 sont donc critiques pour l'assemblage de 4 sous-unités de la sous-famille Kv4 résultant en un canal Kv4 fonctionnel (**Fig. 11**) (Jerng et al. 2004a ; Sweatt 2004). Sur le plan structurel, un domaine T1 prend la forme d'une gondole en suspens (« hanging gondola ») qui est reliée au cœur transmembranaire par un lien avec le segment S1 (lien T1-S1) (Kobertz et al. 2000). Les domaines T1 sont semblables à l'intérieur de la famille de canaux Kv. Par contre, une importante différence existe entre les canaux Kv1 et les autres Kv (Kv2-4) puisque seulement ces derniers contiennent un site de liaison au  $Zn^{2+}$  nécessaire pour l'association de plusieurs sous-unités (Bixby et al. 1999). Dans les familles Kv2-4, la liaison du  $Zn^{2+}$  contribuerait au maintien de l'assemblage tétramérique de la structure quaternaire (Bixby et al. 1999)

**Mécanisme d'inactivation des canaux Kv4.** L'inactivation des canaux ioniques dépendants du voltage est un processus d'autorégulation temporel par lequel une conductance est fermée en réponse à une dépolarisation soutenue ou prolongée (Hille 2001). Chez les canaux  $K^+$ , l'inactivation est une propriété importante qui influence l'excitabilité neuronale. Deux mécanismes d'inactivation de canaux potassiques dépendants du voltage ont été attentivement examinés. Le premier, l'**inactivation de type N** (pour « N-terminus ») a été décrit en détails. Il présente des similarités avec le modèle

« balle et chaîne » à la base de l'inactivation rapide des canaux  $\text{Na}^+$  (Goldin 2003). Ce type d'inactivation a été démontrée chez des canaux Kv1 dans lesquels un petit groupe d'acides aminés de la région N-terminale peut bloquer l'ouverture intracellulaire du canal et interférer avec le passage d'ions (Hoshi et al. 1990 ; Rasmusson et al. 1998). Le second mode d'inactivation de canaux  $\text{K}^+$  ayant été caractérisé est l'**inactivation de type C**. Il a été identifié chez des canaux Kv1 qui ne présentent pas d'inactivation de type N ou chez d'autres qui présentent normalement une inactivation de type N mais dont la région N-terminale a été tronquée (Hoshi et al. 1991 ; Rasmusson et al. 1998). Il a été proposé que l'inactivation de type C repose sur la fermeture de l'ouverture externe du canal qui impliquerait des changements conformationnels coopératifs entre les 4 sous-unités formant le canal (Ogielska et al. 1995). Dans la famille des canaux  $\text{K}^+$ , ce mécanisme d'inactivation serait plus répandu que l'inactivation de type N bien qu'elle reste moins bien comprise (Rasmusson et al. 1998). En effet, des mécanismes similaires à l'inactivation de type C des canaux  $\text{K}^+$  ont été suggérés pour expliquer l'inactivation de canaux  $\text{Na}^+$  (Balser et al. 1996 ; Goldin 2003) et  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhang et al. 1994). Pour ce qui est de la sous-famille Kv4, l'inactivation des canaux à l'état d'équilibre est pratiquement complète et son développement assez rapide est caractéristique de tous les membres de la sous-famille (Jerng et al. 2004a ; Covarrubias et al. 2008). Néanmoins, le mécanisme d'inactivation utilisé par ces canaux n'a pas encore été résolu. Les processus d'inactivation démontrent des caractéristiques non conformes avec la présence de mécanismes classiques d'inactivation de types N ou C rencontrés chez d'autres canaux Kv (Covarrubias et al. 2008).

**Distribution des sous-unités Kv4 dans l'hippocampe.** En hybridation *in situ*, les ARNm codant pour les 3 sous-types de protéines Kv4 (Kv4.1, Kv4.2 et Kv4.3) sont retrouvés dans le cerveau de mammifères. Par contre, l'ARNm Kv4.1 est exprimé à un faible niveau tandis que ceux codant pour Kv4.2 et Kv4.3 sont observés à des niveaux relativement élevés (Serodio & Rudy 1998 ; Vacher et al. 2008). De plus, les transcrits et les protéines Kv4.2 et Kv4.3 sont co-exprimés dans certaines populations neuronales, comme par exemple dans les cellules pyramidales de la région CA3 de l'hippocampe (Serodio & Rudy 1998 ; Vacher et al. 2008). Toutefois, une expression différentielle est majoritairement retrouvée dans le cerveau. C'est le cas dans la région CA1 de

l'hippocampe où une expression préférentielle est retrouvée selon le type cellulaire. En effet, les cellules pyramidales expriment l'ARNm et la protéine Kv4.2 en absence du transcrit ou de la protéine Kv4.3, suggérant que des canaux Kv4.2 homomériques sont probablement les seuls canaux Kv4 présents dans cette population cellulaire (Serodio & Rudy 1998 ; Rhodes et al. 2004 ; Vacher et al. 2008). L'inverse est retrouvé dans les interneurons : des transcrits et des protéines Kv4.3 et une absence d'expression de Kv4.2 (Serodio & Rudy 1998 ; Rhodes et al. 2004 ; Vacher et al. 2008).

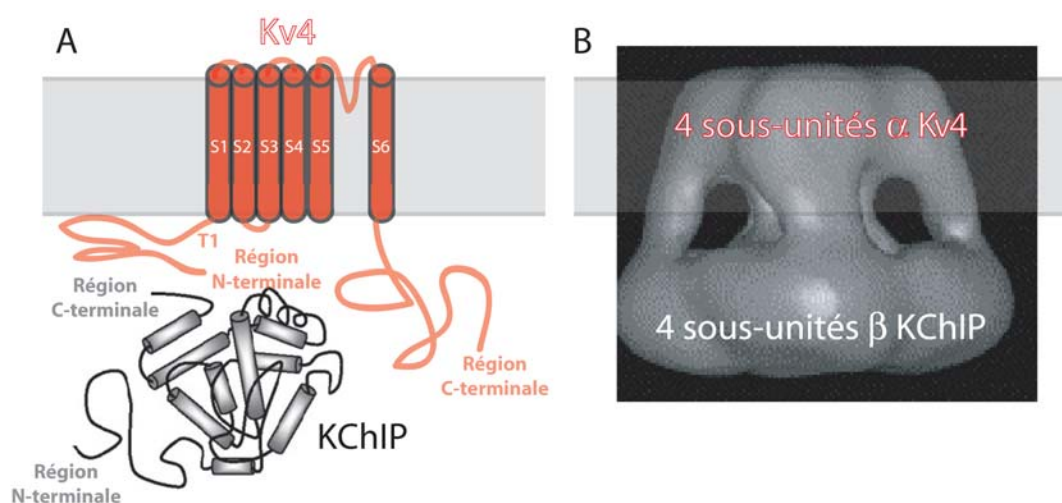
### ***1.7.2.3 Protéines accessoires aux canaux Kv4***

Des protéines accessoires (sous-unités  $\beta$ ) des canaux Kv4 ont été identifiées et modulent la fonction et les propriétés des courants Kv4 en système recombinant. En effet, il a été démontré que des protéines comme les sous-unités Kv $\beta$ , les protéines interagissant avec les canaux Kv (KChIP), la fréquinine et les protéines similaires à la dipeptidyl aminopeptidase (« dipeptidyl aminopeptidase-like » ou DPPL) sont capables de moduler le ciblage membranaire et les propriétés (amplitude du courant, vitesse de récupération de l'inactivation, cinétique d'activation et d'inactivation, etc.) des canaux Kv4 en système d'expression hétérologue (Takimoto et al. 2002 ; Nadal et al. 2003 ; Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004 ; Zagha et al. 2005 ; Jerng et al. 2007 ; Maffie & Rudy 2008).

De plus, l'expression exclusive de sous-unités Kv4 ne reconstitue pas l'entière des propriétés des différents courants  $I_A$  des neurones. Par exemple, les courants  $I_A$  neuronaux vont typiquement s'activer et s'inactiver plus rapidement que les courants Kv4 recombinants, en plus de récupérer plus rapidement de l'inactivation (Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004). Sur la base de telles observations, il a été suggéré que des contributions additionnelles par les protéines accessoires aux canaux Kv4 devaient être déterminantes pour les courants  $I_A$  neuronaux natifs (Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004 ; Maffie & Rudy 2008).

En particulier, un grand nombre de travaux se sont attardés à la famille de sous-unités  $\beta$  KChIP qui comprend quatre membres (KChIP1-4) (Bähring et al. 2001 ; Takimoto et al. 2002 ; Beck et al. 2002 ; Boland et al. 2003 ; Jerng et al. 2004a ; Liang et al. 2009). Ces protéines auxiliaires aux canaux Kv4 ont été identifiées par An et collaborateurs (An et al.

2000). Les protéines KChIP font partie de la famille des senseurs de calcium neuronaux («neuronal calcium sensors» ou NCS). Elles possèdent trois domaines fonctionnels en main EF («EF-hands») liant le  $\text{Ca}^{2+}$  qui sont critiques pour l'interaction efficace avec les sous-unités Kv4 en système recombinant (An et al. 2000 ; Zhou et al. 2004 ; Pioletti et al. 2006 ; Burgoyne 2007). La région N-terminale des sous-unités Kv4 est aussi importante pour les interactions Kv4/KChIP (**Fig. 11**) (Bähring et al. 2001 ; Scannevin et al. 2004 ; Pioletti et al. 2006 ; Wang et al. 2007). Typiquement, en système hétérologue, l'expression des sous-unités KChIP induit une augmentation du ciblage membranaire des sous-unités Kv4. De plus, les courants Kv4/KChIP sont généralement de plus grande amplitude, ils récupèrent plus rapidement de l'inactivation et ils s'activent à des potentiels plus hyperpolarisés (An et al. 2000 ; Boland et al. 2003 ; Jerng et al. 2004a). Conséquemment, les courants Kv4/KChIP exhibent des propriétés qui se rapprochent davantage de celles des courants  $I_A$  natifs, par rapport aux courants induits par l'expression de canaux Kv4 uniquement (An et al. 2000 ; Jerng et al. 2004a).



**FIGURE 11. Interactions Kv4/KChIP**

*A*, Représentation d'une sous-unité  $\alpha$  Kv4 illustrant les 6 domaines transmembranaires, les régions N- et C- terminales cytoplasmiques et le domaine de tétramérisation T1. Une sous-unité auxiliaire KChIP s'associe à la région N-terminale de la protéine Kv4. *B*, Représentation en 3 dimensions de l'association de 4 sous-unités Kv4 transmembranaires et de 4 sous-unités KChIP, obtenue à partir de travaux en microscopie électronique. Figure adaptée de Kim et al. (2004), Birnbaum et al. (2004) et Vacher et al. (2008).

Des expériences en immunocytochimie utilisant des tranches aiguës de cerveau de rongeurs et des anticorps spécifiques à chacun des membres de la famille KChIP ont permis d'étudier la distribution de ces protéines accessoires et de vérifier si elles co-localisent avec des canaux Kv4 neuronaux. Ces résultats révèlent une tendance dans le néocortex : les sous-unités  $\beta$  KChIP2-4 co-localisent fréquemment avec Kv4.2 dans les neurones excitateurs alors que KChIP1 est habituellement co-exprimée avec Kv4.3 dans les interneurons inhibiteurs (Rhodes et al. 2004). Dans la région CA1 de l'hippocampe, on retrouve une telle co-expression préférentielle de la protéine KChIP1 dans les interneurons exprimant Kv4.3 de même qu'une absence de KChIP1 dans les cellules pyramidales exprimant plutôt Kv4.2 (Rhodes et al. 2004 ; Menegola et al. 2008). Ces observations suggèrent que KChIP1 pourrait moduler le courant  $I_A$  et l'excitabilité dans les interneurons de l'hippocampe.

À ce jour, une grande quantité de travaux sur les interactions Kv4/KChIP ont été effectués en système hétérologue et l'idée que de telles interactions pourraient être importantes pour les courants  $I_A$  neuronaux est supportée par les expériences d'hybridation *in situ* et d'immunocytochimie démontrant la co-localisation de protéines Kv4 avec des sous-unités KChIP. Toutefois, peu d'expériences ont directement analysé la contribution des protéines KChIP aux propriétés des courants  $K^+$  transitoires et à la fonction cellulaire mais certains travaux démontrent des résultats intéressants. Dans un premier temps, dans les cellules myocardiques, il a été observé que l'incorporation d'un défaut dans la protéine KChIP2 mène à la perte complète du courant  $K^+$   $I_{to}$  et à une décharge de potentiel d'action augmentée (Kuo et al. 2001). Puis, dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, un lien a été établi entre les niveaux d'ARNm de KChIP3, l'amplitude du courant  $I_A$  et le contrôle de la fréquence de décharge (Liss et al. 2001). Également, la suppression génétique de la sous-unité KChIP3 induit une réduction modérée de l'amplitude du courant  $I_A$  dans les cellules granulaires du gyrus dentelé alors qu'une PLT facilitée y est retrouvée (Lilliehook et al. 2003). Finalement, durant la rédaction de cette thèse, des travaux démontrant la modulation  $Ca^{2+}$ -dépendante du courant  $I_A$  par KChIP3, dans les cellules stellaires du cervelet, ont été publiés (Anderson et al.; sous presse). En conséquence, ces résultats suggèrent que les protéines KChIP contribuent différemment aux courants  $K^+$  et à la fonction des cellules natives selon la sous-unité KChIP et la population cellulaire considérée.



## CHAPITRE II. BUT DE LA THÈSE

---

### 2.1 PROBLÉMATIQUE

La mémoire est un phénomène dont les bases cellulaires et moléculaires sont complexes et incomplètement comprises. Cependant, il est établi que l'hippocampe (une structure du lobe temporal médian) est crucial pour la mémoire déclarative chez les mammifères (Milner et al. 1998 ; Kandel et al. 2000). De plus, le rythme thêta constitue un état important pour cette structure (Vanderwolf 1969 ; Buzsaki 2002). Un modèle « classique » des mécanismes qui sous-tendent la génération du rythme thêta dans la région CA1 de l'hippocampe a identifié plusieurs contributeurs importants (Buzsaki 2002). Toutefois, plusieurs évidences suggèrent que les interneurons du réseau inhibiteur local pourraient soutenir la genèse des oscillations thêta de manière plus complexe que prévue par ce modèle (Klausberger et al. 2003 ; Klausberger & Somogyi 2008).

En particulier, les interneurons LM/RAD de la région CA1 de l'hippocampe démontrent des OPM intrinsèques qui pourraient inhiber rythmiquement plusieurs cellules pyramidales et ainsi contribuer à la génération du rythme thêta (Chapman & Lacaille 1999a ; Chapman & Lacaille 1999b). Des conductances ioniques  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dépendantes du voltage sont à la base des OPM dans les interneurons et des indications pharmacologiques préliminaires suggèrent que le courant  $\text{K}^+$   $I_A$  pourrait être important pour cette activité rythmique (Chapman & Lacaille 1999b). Néanmoins, dans les interneurons de l'hippocampe, l'identité des sous-unités principales et auxiliaires qui sous-tendent le courant potassique transitoire  $I_A$ , de même que les rôles précis joués par ce courant restent méconnus.

Ainsi, le but principal de la présente thèse consiste à déterminer la base moléculaire et la contribution fonctionnelle du courant  $I_A$  dans les interneurons hippocampiques LM/RAD de la région CA1 chez le rongeur.

## 2.2 OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

**La première partie de résultats expérimentaux** de cette thèse (**Chapitre III**) comprend l'article « *Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons* », publié dans *The Journal of Neuroscience*, 27(8):1942-53, en février 2007. Voici la description des objectifs spécifiques de cette partie :

Tout d'abord, des évidences préliminaires ont suggérées que le courant  $I_A$  pouvait être impliqué dans la génération des OPM dans les interneurons hippocampiques (Chapman & Lacaille 1999b). Un premier objectif consistait donc à caractériser le courant  $I_A$  dans les interneurons LM/RAD de l'hippocampe sur les plans biophysique et pharmacologique.

Puis, l'expression en système hétérologue de la sous-unité de canaux Kv4.3 engendre des courants transitoires rappelant les courants  $I_A$  neuronaux (Jerng et al. 2004a) et, dans la région CA1 de l'hippocampe, cette protéine est préférentiellement exprimée au niveau somatodendritique des interneurons multipolaires (Rhodes et al. 2004). Ainsi, le second objectif de cette partie était d'évaluer directement la contribution de la sous-unité principale de canaux potassiques Kv4.3 au courant  $I_A$  et aux OPM des interneurons LM/RAD, en utilisant une approche basée sur la suppression de l'expression de la protéine Kv4.3 dans les interneurons.

Finalement, pour mieux définir dans quelles classes d'interneurons de la région CA1 la protéine Kv4.3 pouvait contribuer au courant  $I_A$  et à la fonction neuronale, le dernier objectif de cette section était de caractériser (en immunocytochimie) les interneurons qui expriment la sous-unité Kv4.3.

**La seconde partie de résultats expérimentaux** de cette thèse (**Chapitre IV**) comprend l'article « *KChIP1 modulation of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents and repetitive firing in hippocampal interneurons* », en préparation pour soumission. Voici la description des objectifs spécifiques de cette partie :

Premièrement, il a été déterminé que les protéines accessoires de la famille KChIP peuvent moduler les propriétés des courants Kv4 en système hétérologue ainsi que de certains

courants transitoires natifs (Lilliehook et al. 2003) (Jerng et al. 2004a). De plus, dans la région CA1 de l'hippocampe, une expression préférentielle de la sous-unité KChIP1 est retrouvée dans les interneurons, similairement à l'expression de Kv4.3 dans cette région (Rhodes et al. 2004). Comme Kv4.3 et KChIP1 pourraient interagir dans les interneurons hippocampiques, un premier objectif était d'étudier les interactions Kv4.3/KChIP1 en système recombinant dans le but de mieux saisir comment Kv4.3 et KChIP1 pourraient agir dans les interneurons hippocampiques.

Pour terminer, l'autre objectif de cette partie était d'évaluer directement la contribution de la protéine KChIP1 aux propriétés du courant  $I_A$ -Kv4.3 et à l'excitabilité des interneurons LM/RAD, en utilisant une approche de suppression de l'expression de KChIP1.

## CHAPITRE III. PREMIÈRE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

---

### 3.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre comporte l'article intitulé :

**« Kv4.3-MEDIATED A-TYPE K<sup>+</sup> CURRENTS UNDERLIE RHYTHMIC  
ACTIVITY IN HIPPOCAMPAL INTERNEURONS ».**

Par Mathieu L. Bourdeau, France Morin, Charles E. Laurent, Mounia Azzi & Jean-Claude Lacaille ; publié dans *The Journal of Neuroscience*, 27(8):1942-53, en février 2007.

### 3.2 ABSTRACT

Hippocampal-dependent learning and memory processes are associated with theta frequency rhythmic activity. Interneuron and pyramidal cell network interactions underlie this activity, but contributions of interneuron voltage-gated membrane conductances remain unclear. We show that interneurons at the CA1 *lacunosum-moleculare* and *radiatum* junction (LM/R) display voltage-dependent subthreshold membrane potential oscillations (MPOs) generated by voltage-gated tetrodotoxin-sensitive Na<sup>+</sup> and 4-aminopyridine (4-AP)-sensitive K<sup>+</sup> currents. They also exhibit prominent 4-AP-sensitive A-type K<sup>+</sup> currents, with gating properties showing activation at subthreshold membrane potentials. We found that LM/R cells are part of specific interneuron subpopulations expressing the K<sup>+</sup> channel subunit Kv4.3 and their transfection with Kv4.3 small interfering RNA (siRNA) selectively impaired A-type K<sup>+</sup> currents and MPOs. Thus our findings reveal a novel function of Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents in the generation of intrinsic MPOs in specific subpopulations of interneurons, that may participate in hippocampal theta-related rhythmic activity.

### 3.3 INTRODUCTION

Theta frequency rhythmic electroencephalographic activity generated in the hippocampus has been implicated in explorative behavior, learning/memory processes and REM sleep (Winson, 1978; Bland, 1986; Vinogradova, 1995; Buzsaki, 2002; Cantero et al., 2003). Hippocampal theta oscillations arise from network activity and are essential in controlling temporal integration and modification of synaptic inputs (Buzsaki, 2002). Extrinsic inputs (Petsche et al., 1962), intrinsic conductances of pyramidal cells (Nunez et al., 1987), and network interactions between inhibitory interneurons and pyramidal cells contribute to theta activity (Klausberger et al., 2003; Somogyi & Klausberger, 2005). Hippocampal and entorhinal theta rhythms *in vivo* are driven by the medial septum (Petsche et al., 1962; Mitchell et al., 1982), but theta-like activity can be generated in isolated hippocampus by cholinergic agonists (MacVicar & Tse, 1989; Fischer et al., 1999). Moreover, theta-frequency range intrinsic membrane potential oscillations (MPOs) occur in entorhinal cortical neurons (Klink & Alonso, 1993), hippocampal CA1 pyramidal cells (Leung & Yim, 1991) and certain inhibitory interneurons (Chapman & Lacaille, 1999b), and likely contribute to theta activity (Chapman & Lacaille, 1999a).

In hippocampal and entorhinal neurons, MPOs arise from an interaction of voltage-dependent  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents activated at subthreshold membrane potentials (Leung & Yim, 1991; Klink & Alonso, 1993; Chapman & Lacaille, 1999a,b; Alonso & Llinas, 1989; Hu et al., 2002). These ionic mechanisms contrast with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  currents implicated in oscillatory activity in other CNS neurons (Jahnsen & Llinas, 1984; Alonso & Llinas, 1992). However, it remains unclear which specific voltage-gated  $\text{K}^+$  currents generate MPOs. In hippocampal interneurons, MPOs are prevented by  $\text{Ba}^{2+}$  and 4-aminopyridine (4-AP) but not by tetraethylammonium (TEA) (Chapman & Lacaille, 1999b). This pharmacological profile suggests that transient A-type  $\text{K}^+$  currents or dendrotoxin-sensitive  $\text{K}^+$  currents ( $\text{I}_D$ ) may be involved in MPO generation (Rudy, 1988; Hurst et al. 1995; Locke & Nerbonne, 1997; Coetzee et al. 1999; Shi et al. 2000). Activation of MPOs at subthreshold membrane potentials (Chapman & Lacaille, 1999b) is also consistent with a potentially important role of these currents (Lien et al., 2002; Coetzee et al. 1999). Interestingly, neuronal A-type  $\text{K}^+$  currents are associated with functions such as regulating firing rate (Rudy, 1988), shaping spike waveform (Zhang & McBain, 1995a) and controlling signal propagation in dendrites (Hoffman et al., 1997) but

have not been linked to generating rhythmic activity. Therefore, our aim was to explore the role of voltage-gated A-type  $K^+$  currents in interneuron MPOs. Moreover, since members of the Kv4 family of voltage-gated  $K^+$  channel  $\alpha$  subunits (Birnbaum et al., 2004) underlie somatodendritic A-type  $K^+$  currents in many neuronal types (Shibata et al., 2000; Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005) and since hippocampal CA1 interneurons highly express the Kv4.3 subtype (Serodio & Rudy, 1998; Rhodes et al., 2004), we examined the role of Kv4.3 in A-type  $K^+$  currents and MPOs in interneurons. Our results uncover a crucial role of Kv4.3 in mediating A-type  $K^+$  currents and generating subthreshold intrinsic rhythmic activity in specific interneuron subpopulations.

### **3.4 MATERIALS AND METHODS**

#### **3.4.1 HIPPOCAMPAL SLICE PREPARATION AND CULTURE**

All animal procedures conformed to the animal welfare guidelines at Université de Montréal. Sixteen to 30 day-old male rats (Sprague-Dawley, Charles River) were deeply anaesthetized with halothane (Halocarbon Laboratories, NJ) and acute hippocampal slices (300  $\mu$ m-thick) were prepared as previously described (Chapman & Lacaille, 1999b).

Organotypic hippocampal slice cultures were prepared and maintained as described (Stoppini et al., 1991). In brief, Sprague-Dawley rats (P7-P12) rats were anesthetized and decapitated. The brain was removed and dissected in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Invitrogen Canada, ON) based medium. Four hundred micron-thick cortico-hippocampal slices were obtained with a McIlwain tissue chopper (Campden Instruments, IN). Three to four slices were placed on Millicell culture plate inserts (Millipore, MA) and incubated for 3 days in OptiMem (Invitrogen Canada, ON) based medium at 37°C in a humidified atmosphere of 5%  $CO_2$  and 95% air. Inserts were then transferred to Neurobasal based medium (Invitrogen Canada, ON). Slices were used for experiments after 3-12 days in culture.

### 3.4.2 ELECTROPHYSIOLOGY

Cells were viewed with an upright microscope (Zeiss Axioskop, Germany) equipped with Hoffmann optics (Modulation optics, NY), a long-range water immersion objective (40X) and an infrared video camera (model 6500, Cohu, San Diego). In the CA1 region, interneurons located at the border of *strata lacunosum-moleculare* and *radiatum* (LM/R), or pyramidal cells from *stratum pyramidale* were visually identified and selected for recordings. All recordings were made at room temperature (20-22°C) using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA). Signals were filtered at 2 kHz (8-pole Bessel filter) and digitized at 10 kHz on a Pentium based computer using pClamp 7.0 or 9.0 (Axon Instruments). Whole-cell current-clamp recordings were made in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 124 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 10 glucose (305 mOsm). Extracellular solutions were saturated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Recording pipettes (WPI, 1.0 mm OD, 2-5 MΩ) were filled with (in mM): 140 K-gluconate, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Tris, 0.4 GTP-Tris and 0.1% biocytin or 0.05% oregon green dextran (285 mOsm, pH 7.2-7.3). The liquid junction potential was 14 mV and corrected. For MPO recordings, steady current injection was used to hold membrane potential at a level which generated occasional spontaneous action potentials, in the presence of antagonists of non-NMDA (CNQX, 20 μM), NMDA (AP5, 50 μM) and GABA<sub>A</sub> (bicuculline, 25 μM) receptors. Channel blockers, tetrodotoxin (TTX, 0.2 μM), 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM), ZD-7288 (10 μM) and XE991 (10 μM) were bath applied. When 5 mM 4-AP was applied, the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP55845A (1 μM) was also added. MPOs were analyzed during segments of membrane potential recordings with spectral analysis (peak frequency and total power between 1.5 and 5 Hz) using pClamp software as previously described (Chapman & Lacaille, 1999b). In experiments with recordings from cells expressing fluorescent proteins in transfected cultured slices, the antioxidant Trolox (0.04 mM) was added to the ACSF.

Voltage-clamp recordings (outside-out patches and whole-cell configuration) were made in ACSF containing (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 23 glucose, (310 mOsm). Patch pipettes (1.0-1.2 mm OD, 2-5 MΩ) were filled

with solution containing (in mM): 120 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 glutathione, 2 ATP-Tris, 0.4 GTP-Tris and 0.1% biocytin or 0.05% oregon green dextran (Molecular Probes, Invitrogen) (300 mOsm). After achieving the whole-cell configuration, leakage and capacitative currents were subtracted on-line using a P/4 procedure. Series resistance was in the range of 5-15 MΩ and compensated by 40-60% during whole-cell voltage-clamp recordings. The liquid junction potential of the solution was 13 mV and corrected. A-type K<sup>+</sup> currents were obtained in the presence of channel blockers by using voltage step protocols and isolated with digital subtractions (Zhang & McBain, 1995b; Lien et al., 2002). The gating properties of A-type K<sup>+</sup> currents in interneurons were characterized using outside-out patch recordings. To obtain the activation curve, we calculated the chord conductance (g) by dividing respective peak currents at different test potentials by the driving force, assuming ohmic behavior and a reversal potential of -101 mV (measured using reversal of tail currents, data not shown). The activation curve was fitted with a Boltzmann function of the form:  $g/g_{\max} = (1 + \exp(-(V - V_{1/2}) / k))^{-1}$ , where  $g/g_{\max}$  is the conductance normalized to its maximal value, V is the membrane potential,  $V_{1/2}$  is the membrane voltage at which the current amplitude is half-maximum, and k is the slope factor. The inactivation curve was also fitted with the following Boltzmann function:  $I/I_{\max} = (1 + \exp((V - V_{1/2}) / k))^{-1}$ , where  $I/I_{\max}$  is the current normalized to its maximal value. All drugs were purchased from Sigma, except for ZD7288 and XE991 from Tocris Cookson (MO), as well as TTX from Alomone Labs (Jerusalem, Israel).

### 3.4.3 HEK293 CELLS

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% foetal bovine serum, penicillin/streptomycin and L-glutamine (Wisent, Canada) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. HEK293 cells were seeded on glass coverslips one day prior to transfection and placed in 35 mm culture dishes containing DMEM. Whole-cell voltage-clamp recordings were made using an extracellular solution containing (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 25 glucose (330 mOsm). Pipettes (OD 1.2 mm, 2-5 MΩ) were filled with (in mM):



140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 10 HEPES and 2 ATP (315 mOsm). The liquid junction potential was 12 mV and corrected.

### 3.4.4 CONSTRUCTS, siRNAs AND TRANSFECTIONS

pcDNA<sub>3</sub>-GFP<sub>10</sub> vector (GFP) was obtained from Dr. M. Bouvier (Université de Montréal), pEYFP-C1 (EYFP) was obtained from Clontech Laboratories (CA), pbkCMV-rKv4.3 (Kv4.3) was a gift from Dr. J.M. Nerbonne (University of Washington, St-Louis, MO) and pHA-CMV-Kv4.2 (Kv4.2) was provided by Dr. A. Shrier (McGill University, Montréal, Canada). All siRNAs were purchased from Dharmacon (CO). Commercial siCONTROL<sup>TM</sup> and cyanine3-tagged siGLO<sup>TM</sup> (siRNA-CTL and Cy3-siRNA-CTL, respectively) were used as non-targeting control siRNAs. siRNA-Kv4.3 target sequences for rat were A.C.U.A.G.U.C.G.C.U.C.C.A.G.C.C.U.U.A.U.U (sense sequence) and 5'-P.U.A.A.G.G.C.U.G.G.A.G.C.G.A.C.U.A.G.U.U.U (antisense sequence). HEK293 cells were transfected using Fugene 6 (Roche, Switzerland), following manufacturer's instructions. Cotransfections were completed using 1.8 µg Kv4.3 cDNA and 0.2 µg GFP cDNA. For siRNA experiments, 10 µl of a 20 µM stock solution were added to the transfection mixture. Cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 48-72 hours (without siRNA) or 48 hours (siRNA experiments) before recordings. Biolistic transfections of neurons in organotypic slice cultures (between 4-6 days in culture) were made using a Helios gene gun (Bio-Rad, CA) following manufacturer's instructions. Gold beads (1.6 µm) were coated with 50 µg EYFP cDNA alone or with 160 µl of 20 µM duplex siRNA. Successful adhesion of siRNAs onto gold beads was verified using cyanine3 tagged siRNA (Cy3-siRNA-CTL; data not shown). Transfected slices were returned to the incubator for 48 hours before experiments. GFP- or EYFP-expressing cells were selected for recordings using an upright microscope equipped with an epifluorescence Fluoarc System and appropriate filters (Zeiss, Germany).

### 3.4.5 IMMUNOCYTOCHEMISTRY

For immunocytochemical detection of Kv4.3 channel subunit in physiologically-characterized LM/R interneurons, cells were labeled with oregon green dextran during recordings and hippocampal slices were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate

buffer (PB, 4°C, overnight). Slices were cryoprotected in 30% sucrose and recut (40 µm-thick) on a freezing microtome (Leica SM2000R, Germany). Sections were treated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min), put in 0.5% blocking agent (30 min, TSA kit, Perkin Elmer, Ontario, Canada) and incubated in rabbit anti-Kv4.3 (1:1000, overnight, RT, Chemicon, CA). The next day, sections were placed in biotinylated goat anti-rabbit IgGs (1:200, 1h, Jackson ImmunoResearch), in the avidin-biotin complex (Elite ABC kit; Vector Laboratories, 1:200, 30min) and in the tyramide amplification solution (1:100, 5 min, Perkin Elmer). Sections were then reincubated in ABC solution (30 min) and placed in texas red-conjugated streptavidin (1:200, 1h, Jackson ImmunoResearch). Sections were rinsed thoroughly between incubations and mounted in Prolong Antifade kit (Molecular Probes). A similar protocol was used for detection of Kv4.3 in transfected HEK293 cells.

For double immunofluorescence detection of Kv4.3 and calcium binding proteins or peptides, male rats (25 to 28 day-old, n=2) were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1M PB. Brains were postfixed for 5 hours and cryoprotected in 30% sucrose. The next day, sections were cut (30 µm in thickness) and incubated in Kv4.3 (1:1000) and mouse antibodies for calbindin D-28k (1:200, Sigma), parvalbumin (1:500, Chemicon), somatostatin (1:200, CURE, UCLA) or cholecystikinin (1:200, CURE, UCLA). The Kv4.3 antibody was revealed as described above except for streptavidin conjugated to Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes) used as the fluorophore, while mouse antibodies were revealed with goat anti-mouse IgGs conjugated to cyanine5 (1:200, 1 h, Jackson ImmunoResearch). Sections were mounted in the Prolong Antifade kit and observed with a Zeiss LSM 510 confocal microscope system (Zeiss Axioskop, Germany; Coherent, Santa Clara, CA) and appropriate filters. Fluorescent images of HEK293 and neurons in acute or cultured hippocampal slices were obtained with an Eclipse E600 microscope (Nikon, Japan) equipped with a Retiga 1300 camera (Q-Imaging, Canada) and a fluorescent lamp (Hamamatsu, Japan). All images were exported and processed in Adobe Photoshop 7.0.

To verify the specificity of antibodies, controls were done by either omitting primary antibodies or by pre-absorbing the primary antibody with its respective antigen (according to the manufacturer's specifications) and in each case no visible staining was detected. We

also confirmed the specificity of the Kv4.3 antibody from Chemicon by using a monoclonal antibody against Kv4.3 (clone K75/41, University of California Davis-National Institute of Neurological Disorders and Stroke-National Institute of Mental Health Neuromab Facility, Davis, CA). A similar distribution of Kv4.3 immunopositive interneurons was observed in the CA1 area (see also Kollo et al., 2006) and a similar proportion of Oregon green-labeled LM/R interneurons exhibiting MPOs were found to be immunopositive for Kv4.3 (data not shown).

### 3.4.6 STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m.). Statistical comparisons between experimental groups were made using unpaired or paired Student's t-tests (two-tailed) as appropriate. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## 3.5 RESULTS

### 3.5.1 MPOs IN LM/R INTERNEURONS DEPEND ON $\text{Na}^+$ AND $\text{K}^+$ CURRENTS

Using whole cell current clamp recordings from visually identified LM/R interneurons in rat hippocampal slices maintained at room temperature, MPOs appear as fluctuations in membrane potential occurring at a frequency near 2 Hz (**Fig. 1**). However, during recordings at more physiological temperature (32°C), MPO frequency has been shown to be in the theta range (6-8 Hz) (Chapman & Lacaille 1999b). MPOs are generated by intrinsic membrane conductances and are independent of glutamate and GABA<sub>A</sub> receptor-mediated synaptic transmission since the antagonists AP5, CNQX and bicuculline did not prevent them (**Fig. 1A-B, D**). The total power of MPOs, measured by spectral analysis, was significantly reduced to  $8.6 \pm 1.2$  % of control ( $n = 24$ ) by -10 mV membrane hyperpolarization, while the peak frequency was unchanged (**Fig. 1E**), indicating that the amplitude but not the frequency of MPOs is dependent on membrane potential. The interplay of voltage-dependent  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  conductances in the production of MPOs (Chapman & Lacaille, 1999b) was confirmed by application of the  $\text{Na}^+$  channel blocker tetrodotoxin (TTX, 0.2  $\mu\text{M}$ ) which abolished action potentials and inhibited the power of MPOs to  $8.9 \pm 2.3$  % of control ( $n = 9$ ) (**Fig. 1E**). The peak frequency was also augmented

but this was a minor effect. Also, application of the  $K^+$  channel blocker, 4-aminopyridine (4-AP, 5 mM) diminished the power of MPOs to  $30.0 \pm 4.5$  % of control ( $n = 12$ ) without affecting the peak frequency (**Fig. 1A,E**). The inhibition of MPOs by 4-AP was reversible ( $92.4 \pm 21.3$  % of control;  $n = 5$ ). These results demonstrate that voltage-gated  $K^+$  currents sensitive to millimolar concentration of 4-AP are implicated in the production of MPOs in LM/R interneurons.

To determine if the hyperpolarization-activated cationic current ( $I_h$ ), which contributes to MPOs in cells of the entorhinal cortex (Klink & Alonso, 1993), is involved in MPOs in interneurons, we applied the specific  $I_h$  blocker ZD7288 (10  $\mu$ M). ZD7288 had no significant effect on total power ( $78.4 \pm 13.9$  % of control,  $n = 5$ ) or peak frequency of MPOs in interneurons (**Fig. 1B,E**). In contrast, inward rectification observed in interneurons in response to hyperpolarizing current (Maccaferri & McBain, 1996) was abolished by ZD7288 (rectification ratio:  $1.30 \pm 0.09$  in control vs.  $1.00 \pm 0.04$  in ZD7288,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ; **Fig. 1C**), confirming the block of  $I_h$  currents in interneurons displaying MPOs. Thus,  $I_h$  does not contribute to the generation of MPOs in LM/R interneurons. To examine if the muscarine-sensitive  $K^+$  current ( $I_M$ ), which is important for subthreshold resonance in hippocampal pyramidal cells (Hu et al. 2002), is involved in interneuron MPOs, we used the specific  $I_M$  blocker XE991 (10  $\mu$ M) (Hu et al. 2002). Application of XE991 had no significant effect on the power ( $124.7 \pm 17.7$  % of control,  $n = 5$ ) and peak frequency of MPOs (**Fig. 1D,E**), but caused a membrane depolarization in interneurons ( $V_m$ :  $-62.2 \pm 0.8$  mV to  $-59.3 \pm 0.9$  mV;  $n = 5$ ) consistent with inhibition of  $I_M$  (Hu et al. 2002). These results suggest that  $I_M$  is not necessary for the generation of MPOs in LM/R interneurons.

### 3.5.2 PROPERTIES OF A-TYPE $K^+$ CURRENTS AND EXPRESSION OF Kv4.3 IN LM/R INTERNEURONS

Since A-type  $K^+$  currents are transient voltage-gated currents activated at subthreshold membrane potentials and sensitive to 4-AP (Serodio et al., 1996; Lien et al., 2002), we hypothesized that these currents could be involved in MPOs in LM/R interneurons. Thus, we characterized the biophysical properties of A-type  $K^+$  currents in outside-out patches

from LM/R interneurons. In the presence of TTX (0.5  $\mu$ M) and TEA (20 mM), K<sup>+</sup> currents were evoked by 200 ms test pulses from a hyperpolarized membrane potential and consisted of rapidly inactivating and non-inactivating components (**Fig. 2A**). In contrast, K<sup>+</sup> currents that were evoked by similar test pulses from a depolarized membrane potential were composed of only a non-inactivating “delayed” component (**Fig. 2A**). A-type K<sup>+</sup> currents were isolated by subtracting the non-inactivating component from the mixed rapidly inactivating and non-inactivating currents (**Fig. 2A**) (Zhang & McBain, 1995b, Song et al., 1998). The mean amplitude of A-type K<sup>+</sup> currents evoked by a test pulse to 57 mV was  $712.2 \pm 85.9$  pA ( $n = 17$ ). The 20-80 % risetime of A-type K<sup>+</sup> currents was  $0.7 \pm 0.1$  ms ( $n = 10$ ) while the inactivation phase (decay) was fitted by a biexponential function with time constants of  $\tau_{\text{fast}} = 6.0 \pm 0.3$  ms and  $\tau_{\text{slow}} = 22.8 \pm 1.2$  ms ( $n = 9$ ; relative amplitude contributions  $\tau_{\text{fast}} = 65.0 \pm 6.9$  % and  $\tau_{\text{slow}} = 35.0 \pm 7.0$  %). Additionally, the time course of recovery from inactivation for A-type K<sup>+</sup> currents (measured by test pulses to 57 mV from holding of -73 mV) was quite rapid ( $40.4 \pm 1.5$  ms;  $n = 6$ ). The activation curve was fitted by a Boltzmann function with half-maximal ( $V_{1/2}$ ) activation at  $-16.9 \pm 0.2$  mV and a slope factor ( $k$ ) of  $15.8 \pm 0.9$  mV ( $n = 14$ ; **Fig. 2C**). The inactivation of A-type K<sup>+</sup> currents was studied by applying 1-sec pre-pulses followed by a test pulse (**Fig. 2B**). The inactivation curve was also described by a Boltzmann function with a midpoint potential ( $V_{1/2}$ ) of  $-86.1 \pm 0.1$  mV and a slope factor ( $k$ ) of  $12.1 \pm 0.4$  mV ( $n = 10$ ; **Fig. 2C**). The intersection of the activation and inactivation curves for A-type K<sup>+</sup> currents (**Fig. 2C**) indicated the presence of a window current near subthreshold membrane potentials at which MPOs were observed. Thus, our results indicate that LM/R interneurons display prominent A-type K<sup>+</sup> currents with gating properties consistent with activation at subthreshold membrane potentials. Since MPOs are sensitive to 4-AP, we examined the effects of 4-AP on A-type K<sup>+</sup> currents in outside-out patches (**Fig. 2A**). The peak amplitude of A-type K<sup>+</sup> currents was significantly reduced by 5 mM 4-AP ( $61.7 \pm 9.9$  % of control;  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ) without significant effects on decay time constants ( $\tau_{\text{fast}}$ ,  $80.8 \pm 17.6$  % of control;  $\tau_{\text{slow}}$ ,  $85.7 \pm 34.9$  % of control;  $n = 6$ ). The effects of 4-AP were partially reversible and the amplitude of A-type K<sup>+</sup> currents returned to  $79.4 \pm 8.3$  % of control ( $n = 4$ ) after wash-out. Application of a lower concentration of 4-AP (60  $\mu$ M) did not significantly affect the amplitude of A-type K<sup>+</sup> currents ( $94.6 \pm 31.7$  % of control,  $n =$

3) nor their decay time constants ( $\tau_{\text{fast}}$ ,  $73.2 \pm 20.9$  % of control;  $\tau_{\text{slow}}$ ,  $89.8 \pm 21.3$  % of control,  $n = 3$ ). Thus, these results indicate that A-type  $K^+$  currents, like MPOs, are sensitive to 4-AP.

Since  $K^+$  channels composed of Kv4 subunits are major contributors of somatodendritic A-type  $K^+$  currents (Serodio et al., 1996; Birnbaum et al., 2004) and since CA1 interneurons highly express Kv4.3 mRNA (Serodio & Rudy, 1998) and protein (Rhodes et al., 2004), we examined if interneurons displaying A-type  $K^+$  currents and MPOs also express Kv4.3 by combining cell labeling during whole-cell recording with immunohistochemistry. Ninety-three percent of interneurons filled with oregon green during whole-cell recordings that displayed A-type  $K^+$  currents in outside-out patch recordings were also immunopositive for Kv4.3 ( $n = 14$ ; **Fig. 2D**). The Kv4.3 protein was located in the somatodendritic compartment of interneurons. Moreover, 71% percent of Oregon green-filled interneurons which showed MPOs, were also Kv4.3-immunopositive ( $n = 24$ ; **Fig. 2E**). These results demonstrate that Kv4.3 is present in the somatodendritic compartment of LM/R interneurons displaying A-type  $K^+$  currents and MPOs, consistent with a possible implication of this  $K^+$  channel subunit in these physiological responses.

### **3.5.3 Kv4.3-MEDIATED A-TYPE $K^+$ CURRENTS AND FUNCTIONAL KNOCKDOWN IN RECOMBINANT SYSTEM**

With the goal of interfering with Kv4.3 expression in interneurons, we first established that small interfering RNA (siRNA) could be used for functional knockdown of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents in a heterologous expression system. Human embryonic kidney (HEK293) cells were cotransfected with Kv4.3 cDNA and green fluorescent protein (GFP) constructs. Immunocytochemistry was used first to establish that GFP-positive cells were immunopositive for Kv4.3 (**Fig. 3A**;  $n = 4$  cultures, 2 experiments). Then, whole-cell recordings were obtained from GFP-positive HEK293 cells.  $K^+$  currents were evoked by test pulses from a hyperpolarized membrane potential and consisted of transient and sustained components (**Fig. 3B**).  $K^+$  currents evoked from a depolarized membrane potential consisted of only sustained  $K^+$  currents. Peak A-type  $K^+$  currents, isolated using digital subtraction and elicited by voltage step to 28 mV, had a current

density ( $I_{\text{density}}$ ) of  $79.7 \pm 14.0$  pA/pF ( $n = 30$ ) (**Fig. 3B**). Cells transfected with GFP alone lacked such transient A-type  $K^+$  currents ( $I_{\text{density}}$ ,  $5.6 \pm 1.6$  pA/pF) and only presented endogenous sustained  $K^+$  currents (**Fig. 3B**) (Yu & Kerchner, 1998). Therefore, expression of Kv4.3 in HEK293 cells results in A-type  $K^+$  currents (Barry et al., 1998; Cotella et al., 2005). Next, we ascertained the efficacy of a siRNA sequence targeting Kv4.3 mRNA (siRNA-Kv4.3) in preventing the expression of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents. Efficient delivery of siRNAs to HEK293 cells was assessed using a cyanine3-tagged non-targeting siRNA (Cy3-siRNA-CTL) (**Fig. 3C**;  $n = 5$  cultures, 2 experiments). Using electrophysiological recordings, we observed that cotransfection of Kv4.3, GFP, and siRNA-Kv4.3 significantly reduced Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents ( $I_{\text{density}}$ ,  $36.7 \pm 12.0$  % of control,  $n = 20$ ) compared to cells cotransfected with Kv4.3, GFP and a non targeting siRNA sequence (siRNA-CTL,  $n = 19$ ) (**Fig. 3D**). In contrast, the endogenous sustained  $K^+$  currents were unaffected by siRNA-Kv4.3 transfection ( $I_{\text{density}}$ ,  $76.9 \pm 8.6$  % of control,  $n = 20$ ) (**Fig. 3D**). To verify the specificity of Kv4.3 siRNA, we expressed the closely related Kv4.2 subunit in HEK293 cells. When Kv4.2, GFP and siRNA-CTL were cotransfected in HEK293 cells, typical transient A-type  $K^+$  currents were observed ( $I_{\text{density}}$ , at 28 mV,  $67.9 \pm 19.1$  pA/pF,  $n = 19$ ; **Fig. 3E**). Following cotransfection of Kv4.2, GFP and siRNA-Kv4.3, Kv4.2-mediated A-type  $K^+$  currents were not different from control ( $I_{\text{density}}$ ,  $89.7 \pm 16.4$  % of control,  $n = 19$ ; **Fig. 3E**). Hence, our results indicate a selective functional knockdown of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents in recombinant system by Kv4.3 siRNA (Cotella et al., 2005).

### 3.5.4 Kv4.3 siRNA SELECTIVELY REDUCES A-TYPE $K^+$ CURRENTS IN LM/R INTERNEURONS

To evaluate the contribution of Kv4.3 to A-type  $K^+$  currents in interneurons, we used biolistic transfection of Kv4.3 siRNA in slice cultures (Govek et al., 2004). First, we established that whole-cell  $K^+$  currents were similar in LM/R interneurons in cultured compared to acutely isolated slices. In TTX (1  $\mu$ M), cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ; 150  $\mu$ M) and TEA (1 mM), whole-cell  $K^+$  currents were composed also of transient and non-inactivating components (**Fig. 4A**). Moreover, A-type  $K^+$  currents had a similar  $I_{\text{density}}$  and sensitivity to 4-AP in interneurons in cultured and acute slices (**Supplemental Table 1**).

A-type  $K^+$  currents were also comparable in interneurons biolistically transfected with EYFP in comparison to untransfected (**Fig. 4B**; **Supplemental Table 1**). Finally, using biocytin labelling, we verified that EYFP-expressing interneurons were non-pyramidal cells (**Fig. 4B,C**) with morphological characteristics similar to those of LM/R cells in acute hippocampal slices (Chapman & Lacaille, 1999b). Thus, EYFP-expressing LM/R interneurons in slice cultures exhibit A-type  $K^+$  currents and cellular properties similar to interneurons in acute slices.

Next, we assessed the functional consequence of Kv4.3 siRNA transfection on A-type  $K^+$  currents in LM/R interneurons. We verified that basic membrane properties and A-type  $K^+$  currents of interneurons transfected with EYFP and siRNA-CTL were similar (**Supplemental Table 1**). In contrast, in interneurons cotransfected with EYFP and Kv4.3 siRNA, the peak  $I_{\text{density}}$  of A-type  $K^+$  currents, was significantly reduced ( $38.1 \pm 8.0$  % of control,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ; **Fig. 4D**) compared to interneurons cotransfected with EYFP and control siRNA. Kv4.3 siRNA transfection did not affect activation ( $V_{1/2} = -3.0 \pm 2.0$  mV,  $k = 13.4 \pm 1.3$  mV,  $n = 7$  for control siRNA;  $V_{1/2} = 0.3 \pm 2.4$  mV,  $k = 10.4 \pm 0.3$ ,  $n = 6$  for Kv4.3 siRNA) or inactivation ( $V_{1/2} = -61.5 \pm 3.3$  mV,  $k = -9.0 \pm 0.9$  mV,  $n = 5$  for control siRNA;  $V_{1/2} = -58.1 \pm 5.2$  mV,  $k = -9.5 \pm 0.7$ ,  $n = 4$  for Kv4.3 siRNA) properties of A-type  $K^+$  currents. Moreover, delayed rectifier  $K^+$  currents were not significantly affected by Kv4.3 siRNA transfection ( $I_{\text{density}}$   $131.5 \pm 31.0$  % of control,  $n = 6$ ; **Fig. 4D**). Thus, the functional knockdown produced by siRNA-Kv4.3 is selective to A-type  $K^+$  currents. We further established the selectivity of the functional knockdown produced by Kv4.3 siRNA by recordings of A-type  $K^+$  currents in CA1 pyramidal cells which are thought to be mostly mediated by Kv4.2 rather than Kv4.3 (Serodio & Rudy, 1998; Rhodes et al., 2004; Kim et al., 2005). Again, A-type  $K^+$  currents were similar in EYFP-transfected and untransfected pyramidal cells ( $89.5 \pm 17.5$  % of control,  $n = 5$ ; **Fig. 5A-C**). Moreover, transfection with Kv4.3 siRNA did not alter either A-type ( $100.7 \pm 30.9$  % of control,  $n = 5$ ) or delayed rectifier ( $89.8 \pm 14.7$  % of control,  $n = 5$ )  $K^+$  currents in pyramidal cells compared to control siRNA transfection (**Fig. 5D**). Thus, Kv4.3 siRNA transfection selectively reduced A-type  $K^+$  currents in interneurons, consistent with the cell-type specific expression of Kv4.3 in CA1 hippocampus.



### 3.5.5 Kv4.3 siRNA IMPAIRS MPOs IN LM/R INTERNEURONS

Next, we examined the functional consequence of reducing A-type  $K^+$  currents by Kv4.3 siRNA transfection on interneuron excitability and rhythmic activity. First, since Kv4-mediated A-type  $K^+$  currents shape action potential waveform in pyramidal and Purkinje cells (Shibata et al., 2000; Kim et al., 2005; Yuan et al., 2005), we verified the effects of Kv4.3 siRNA transfection on interneuron action potential properties. Action potential amplitude (**Fig. 6B**), threshold and afterhyperpolarization (**Supplemental Table 1**) were not significantly changed following Kv4.3 vs control siRNA transfection. In contrast, action potential duration at half amplitude ( $APD_{\text{half-width}}$ ) was significantly longer in interneurons transfected with Kv4.3 vs control siRNA ( $154.0 \pm 10.8$  % of control,  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ; **Fig. 6A,B**). Again, as with other membrane properties tested,  $APD_{\text{half-width}}$  was similar in EYFP-expressing and untransfected interneurons (**Supplemental Table 1**). Application of 4-AP (5 mM), which blocks A-type  $K^+$  currents, also significantly increased  $APD_{\text{half-width}}$  ( $325.7 \pm 60.8$  % of control,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ; **Fig. 6A,B**). 4-AP did not significantly change action potential amplitude ( $102.5 \pm 2.2$  % of control), threshold ( $111.5 \pm 4.6$  % of control) or AHP amplitude ( $101.8 \pm 13.5$  % of control) in the same cells. Having verified that Kv4.3 siRNA affected action potential waveform in interneurons, we next determined the contribution of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents to subthreshold MPOs in interneurons. MPOs were present in LM/R interneurons in cultured slices (**Fig. 6**) but their power was smaller and peak frequency elevated in comparison to acute slices (**Supplemental Table 1**). Other MPO properties were generally similar to those in interneurons in acute slice: prevented by membrane hyperpolarization ( $8.3 \pm 1.4$  % of control,  $n = 22$ ), 0.2  $\mu\text{M}$  TTX ( $7.7 \pm 3.1$  % of control,  $n = 6$ ) and 5 mM 4-AP ( $26.8 \pm 8.1$  % of control,  $n = 5$ ) (**Fig. 6C,D**; compare to **Fig. 1**). However, transfection of Kv4.3 siRNA impaired MPOs in interneurons. The power of MPOs was significantly decreased in interneurons transfected with Kv4.3 siRNA compared to control siRNA ( $53.3 \pm 12.5$  % of control,  $P < 0.05$ ;  $n = 10$ ), while the peak frequency of MPOs was unchanged (**Fig. 6E,F**). Overall, these data show that Kv4.3 siRNA, which produced a functional knockdown of A-type  $K^+$  currents, resulted in inhibition of MPOs and broadening of action potentials. Thus, Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents play a critical role in subthreshold

membrane potential oscillations, in addition to regulating action potential firing, in interneurons.

### 3.5.6 SPECIFIC INTERNEURON SUBPOPULATIONS EXPRESSING Kv4.3

We investigated next in more detail the CA1 interneuron subpopulations which express Kv4.3, using double immunofluorescence against Kv4.3 and specific markers of interneuron subpopulations, the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins parvalbumin (PV) and calbindin (CB), and the peptides somatostatin (SOM) and cholecystokinin (CCK) (Freund and Buzsaki, 1996). Interneurons immunopositive for each marker were first quantified according to their soma location within hippocampal CA1 layers (*oriens/alveus*, O/A; *pyramidale*, PYR; *radiatum*, RAD and *lacunosum-moleculare*, LM) and then the proportion of interneurons in each layer which colocalized Kv4.3 was assessed (**Table 1**). The majority of PV-immunopositive interneurons (81/84 neurons) were located within the pyramidal layer and only 12% of these cells coexpressed Kv4.3 (**Fig. 7A**). Calbindin-positive neurons were found in all hippocampal layers but Kv4.3 colocalization was higher in RAD and LM (50 and 70 %, respectively) than O/A and PYR (20 % each; **Fig. 7B**). Somatostatin-positive neurons were mostly found in O/A, however very few of these SOM-positive cells colocalized Kv4.3 (13 %, **Fig. 7C**). Interestingly, the small proportion of SOM-positive cells found in PYR showed a high percentage of Kv4.3 colocalization (80 %). Cholecystokinin-immunopositive neurons were distributed in all hippocampal layers but the majority was located in LM. The proportion of CCK-positive interneurons coexpressing Kv4.3 was highest in LM (88 %), less in PYR and RAD (25 and 33 %, respectively) and null in O/A (**Fig. 7D**). Therefore, some interneuron subpopulations preferentially express Kv4.3 and include CCK-positive interneurons in LM, CB-positive interneurons in RAD and LM, and SOM-positive interneurons of PYR. Thus, Kv4.3 may play a critical role in A-type K<sup>+</sup> currents and rhythmic activity in these specific CA1 interneuron subpopulations.

### 3.6 DISCUSSION

Our principal findings are that hippocampal interneurons display subthreshold MPOs generated by an interplay of  $\text{Na}^+$  and 4-AP-sensitive A-type  $\text{K}^+$  currents, independent of hyperpolarization-activated cationic currents  $I_h$ , and muscarine-sensitive  $\text{K}^+$  currents,  $I_M$ . We show that A-type  $\text{K}^+$  currents are prominent in LM/R interneurons, have a window of activation at subthreshold membrane potentials, and are inhibited by 4-AP. Kv4.3  $\alpha$ -subunits of  $\text{K}^+$  channels mediate LM/R interneuron A-type  $\text{K}^+$  currents since i) interneurons with A-type  $\text{K}^+$  currents and MPOs were immunopositive for Kv4.3, ii) Kv4.3 expression generated A-type  $\text{K}^+$  currents in HEK293 cells, and iii) Kv4.3 siRNA transfection functionally knocked-down A-type  $\text{K}^+$  currents in HEK293 cells and LM/R interneurons. Kv4.3 siRNA-induced impairment was  $\text{K}^+$  current- and cell type-selective as Kv4.2-mediated A-type  $\text{K}^+$  currents were unchanged in HEK293 cells, sustained/delayed rectifier  $\text{K}^+$  currents unaffected in HEK293 cells or interneurons, and A-type currents unimpaired in CA1 pyramidal cells. Kv4.3 siRNA transfection prevented interneuron MPOs and broadened action potentials, uncovering a critical role of Kv4.3 A-type  $\text{K}^+$  currents in MPO generation. Finally, specific interneuron subpopulations preferentially expressed Kv4.3: cholecystokinin-positive interneurons of *stratum lacunosum-moleculare* (LM), calbindin-positive interneurons of *strata radiatum* and LM, and somatostatin-positive interneurons of *stratum pyramidale*. Our findings reveal a novel role for Kv4.3-mediated A-type  $\text{K}^+$  currents in the generation of intrinsic MPOs in specific subpopulations of interneurons, which are important for CA1 hippocampal rhythmic activity.

Our findings provide novel evidence about intrinsic membrane currents critically underlying LM/R interneuron MPOs. Consistent with results in CA1 pyramidal cells (Leung & Yim, 1991) and entorhinal stellate cells (Klink & Alonso, 1993), TTX-sensitive  $\text{Na}^+$  currents are key contributors to MPO generation in LM/R interneurons (Chapman & Lacaille, 1999b). Since MPOs are present at subthreshold membrane potentials in absence of sustained repetitive spiking, persistent subthreshold  $\text{Na}^+$  currents are implicated in interneurons, as in entorhinal cells (Klink & Alonso, 1993). However, other membrane currents involved in rhythmic activity contribute in a cell type-specific manner. First, non-

selective cationic currents  $I_h$ , critical for MPOs in entorhinal stellate cells (Klink & Alonso, 1993; Dickson et al., 2000) and for subthreshold theta-frequency resonance in CA1 pyramidal cells (Hu et al., 2002), are not implicated in interneurons since interneuron MPOs were not prevented by the selective  $I_h$  blocker ZD7288, or by extracellular  $\text{Cs}^+$  (Chapman & Lacaille, 1999b). Second, muscarine-sensitive  $\text{K}^+$  currents  $I_M$ , important for CA1 pyramidal cell theta-frequency resonance (Hu et al., 2002), appear not involved since MPOs are unaffected by the selective  $I_M$  blocker, XE991. Finally,  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent currents, critical for oscillatory activity in thalamic neurons (Jahnsen & Llinas, 1984; Luthi & McCormick, 1998), are unnecessary in interneurons since interneuron MPOs persist in presence of  $\text{Ca}^{2+}$ -free extracellular solution or  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker  $\text{Cd}^{2+}$  (Chapman & Lacaille, 1999b). Thus, intrinsic MPOs in LM/R interneurons are produced by a cell-type specific interplay of voltage-gated  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents, independent of  $I_h$ ,  $I_M$ , voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  currents and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  currents ( $I_{\text{KCa}}$ ).

Native somatodendritic A-type  $\text{K}^+$  currents arise from multimeric  $\text{K}^+$  channels composed of pore-forming  $\alpha$  subunits of the Kv4 family (Sheng et al., 1992; Serodio et al., 1996; Song, 2002), in association with auxiliary subunits, like Kv $\beta$  subunits,  $\text{K}^+$  channel interacting proteins (KChIPs), frequenin and DPPX (reviewed in Birnbaum et al., 2004). In CA1 hippocampus, a cell-type specific differential expression of Kv4 subtypes has been suggested with pyramidal cells highly expressing the Kv4.2 subtype and interneurons strongly expressing Kv4.3 (Martina et al., 1998; Serodio & Rudy, 1998; Lien et al. 2002; Rhodes et al., 2004). Moreover, A-type  $\text{K}^+$  currents appeared predominantly mediated by Kv4.3 channels in CA1 *stratum oriens/alveus* interneurons (Lien et al., 2002). We obtained multiple lines of evidence indicating that Kv4.3 mediates A-type  $\text{K}^+$  currents in LM/R interneurons. First, LM/R interneurons with A-type  $\text{K}^+$  currents in voltage-clamp recordings were identified as Kv4.3 immunopositive, indicating that A-type  $\text{K}^+$  current presence was correlated with Kv4.3 expression in the same cell. Second, Kv4.3 expression in HEK293 cells was sufficient to generate A-type  $\text{K}^+$  currents. Third, transfection of a siRNA sequence targeting Kv4.3 mRNA selectively inhibited Kv4.3-mediated A-type  $\text{K}^+$  currents in HEK293 cells, as well as native A-type  $\text{K}^+$  currents in LM/R interneurons in slice cultures. This  $\text{K}^+$  current functional knockdown was unlikely a non-specific effect of siRNA transfection, since A-type  $\text{K}^+$  currents were selectively diminished and delayed

rectifier  $K^+$  currents, mediated by Kv subunits other than Kv4 (Coetzee et al., 1999; Song, 2002), were unchanged in interneurons. Additionally, Kv4.3 siRNA effects were cell-type specific as CA1 pyramidal cell A-type  $K^+$  currents, thought to be mediated by Kv4.2 (Serodio & Rudy, 1998; Rhodes et al., 2004; Kim et al., 2005), were unaltered.

Having identified Kv4.3 as a  $K^+$  channel subunit mediating LM/R interneuron A-type  $K^+$  currents enabled us to show directly that A-type  $K^+$  currents contribute to MPOs in these cells. Using Kv4.3 siRNA transfection of LM/R interneurons in slice cultures, we uncovered clear impairment of MPOs following A-type  $K^+$  current functional knockdown. These results were entirely consistent with our findings of clear correlation between Kv4.3 expression and MPOs in individual interneurons with current-clamp recordings and Kv4.3 immunodetection. Moreover, compatible with known roles of A-type  $K^+$  currents in regulating action potential onset and shape (Zhang & McBain, 1995a; Rudy, 1988; Hoffman et al., 1997; Kim et al., 2005), Kv4.3 siRNA transfection resulted in a significant broadening of interneuron action potentials (see also Shibata et al., 2000; Yuan et al., 2005). Overall, our results clearly show that A-type  $K^+$  current functional knockdown by Kv4.3 siRNA significantly impaired LM/R interneuron MPOs, revealing an essential role for Kv4.3-mediated A-type currents in generating such intrinsic rhythmic activity in hippocampal interneurons. Our results are consistent with pharmacological evidence that interneuron A-type  $K^+$  currents (Lien et al. 2002) and MPOs (Chapman & Lacaille 1999b) are sensitive to the  $K^+$  channel blocker 4-AP but not to TEA. However, our results do not rule out that other  $K^+$  currents sensitive to 4-AP and  $Ba^{2+}$  (Chapman & Lacaille 1999b) might also contribute to MPOs. Indeed, our observation that 4-AP effects on MPOs are larger than Kv4.3 siRNA effects suggests that other 4-AP sensitive  $K^+$  currents may also contribute. It is unlikely that fast delayed rectifier  $K^+$  currents are necessary since they are blocked by TEA (Lien et al. 2002) whereas MPOs are not affected (Chapman & Lacaille 1999b). However, certain Kv1 channels that underlie dendrotoxin-sensitive  $K^+$  currents ( $I_D$ ) and that operate at subthreshold membrane potentials, are resistant to TEA but sensitive to 4-AP (Coetzee et al. 1999) and  $Ba^{2+}$  (Hurst et al. 1995). Although dendrotoxin-sensitive  $I_D$  currents were reportedly absent in CA1 *oriens/alveus* interneurons (Zhang & McBain, 1995b; Lien et al. 2002), they could be present in specific interneuron subtypes,

like LM/R cells. Further work will be important to resolve a possible additional contribution of  $I_D$  currents to MPOs in LM/R interneurons.

Our recordings of prominent A-type  $K^+$  currents in outside-out patches from LM/R interneurons are also consistent with a cell-specific role of A-type  $K^+$  currents in MPOs. Although interneurons in *stratum oriens/alveus* exhibit A-type currents (Zhang & McBain, 1995a), specific interneuron cell types in LM/R were previously reported to display much more prominent A-type currents in dissociated cells from CA1 area (Fan & Wong, 1996). Our results with LM/R interneurons in acutely isolated slices demonstrate that A-type  $K^+$  currents in outside-out patches exhibit a window of activation corresponding to the subthreshold membrane potentials at which MPOs are observed, suggesting that A-type  $K^+$  current gating properties are compatible with a role in MPO generation in these interneurons. Moreover, using double immunofluorescence against Kv4.3 and interneuron-specific cell markers like  $Ca^{2+}$ -binding proteins and peptides, we uncovered distinct interneuron subpopulations preferentially expressing Kv4.3 subunits. Although Kv4.3-immunopositive interneurons were found in all hippocampal layers (Rhodes et al., 2004), they colabelled with cholecystokinin-positive interneurons of *stratum lacunosum-moleculare* (LM), calbindin-positive interneurons of *strata radiatum* and LM, and somatostatin-positive interneurons of *stratum pyramidale*. Thus, Kv4.3 may be important for A-type  $K^+$  currents and regulation of somatodendritic excitability in these specific interneuron subpopulations, supporting an interneuron subtype-specific role of Kv4.3 in MPOs, and, consequently, in hippocampal rhythmic activity.

Hippocampal theta rhythmic activity *in vivo* is driven by a combination of extrinsic inputs and network interactions between pyramidal cells and inhibitory interneurons (Buzsaki, 2002; Klausberger et al., 2003; Somogyi & Klausberger, 2005). Our work further indicates that such rhythmic activity likely involves additional synergistic interactions with intrinsic membrane conductances of individual interneurons, as suggested for CA1 pyramidal cells (MacVicar & Tse, 1989; Leung & Yim, 1991; Konopacki et al., 1987; Chapman & Lacaille, 1999a) and entorhinal stellate cells (Klink & Alonso, 1993). Thus, our findings identify a critical contribution of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents in MPOs in specific interneuron subpopulations that may be important for hippocampal rhythmic theta activity.

Such a role in regulation of rhythmic activity expands the function of neuronal A-type  $K^+$  currents beyond their previously established roles in regulation of firing rate (Rudy, 1988), action potential waveform (Zhang & McBain, 1995a) and dendritic signalling (Hoffman et al., 1997).

### 3.7 REFERENCES

**Alonso A, Llinas RR.** Subthreshold  $Na^+$ -dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342: 175-177, 1989.

**Alonso A, Llinas RR.** Electrophysiology of the mammillary complex in vitro. II. Medial mammillary neurons. *J Neurophysiol* 68: 1321-1331, 1992.

**Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM.** Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ Res* 83: 560-567, 1998.

**Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader LA.** Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* 84: 803-833, 2004.

**Bland BH.** The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol* 26: 1-54, 1986.

**Buzsaki G.** Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33:325-340. 2002.

**Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B** Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 23: 10897-10903, 2003.

**Chapman CA, Lacaille JC.** Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing. *J Neurosci* 19: 8637-8645, 1999a.

**Chapman CA, Lacaille JC.** Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of *stratum lacunosum-moleculare*. *J Neurophysiol* 81: 1296-1307, 1999b.

**Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Molecular diversity of  $K^+$  channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 233-285, 1999.

**Cotella D, Jost N, Darna M, Radicke S, Ravens U, Wettwer E.** Silencing the cardiac potassium channel Kv4.3 by RNA interference in a CHO expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 555-560, 2005.

**Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky MH, Fransen E, Hasselmo ME, Alonso A.** Properties and role of I(h) in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 83: 2562-2579, 2000.

**Fan SH, Wong RK.** Selective expression of transient outward currents in different types of acutely isolated hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 76: 3563-3567, 1996.

**Fischer Y, Gahwiler BH, Thompson SM.** Activation of intrinsic hippocampal theta oscillations by acetylcholine in rat septo-hippocampal cocultures. *J Physiol* 519 Pt 2: 405-413, 1999.

**Freund TF, Buzsaki G.** Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470, 1996.

**Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L.** The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7: 364-372, 2004.

**Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D.** K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387: 869-875, 1997.

**Hu H, Vervaeke K, Storm JF.** Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 545: 783-805, 2002.

**Hurst RS, Latorre R, Toro L, Stefani E.** External barium block of Shaker potassium channels: evidence for two binding sites. *J Gen Physiol* 106: 1069-1087, 1995.

**Jahnsen H, Llinas R.** Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones *in vitro*. *J Physiol* 349:227-247, 1984.

**Kim J, Wei DS, Hoffman DA.** Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* 569: 41-57, 2005.

**Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P.** Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons *in vivo*. *Nature* 421: 844-848, 2003.

**Klink R, Alonso A.** Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 70: 144-157, 1993.



**Kollo M, Holderith NB, Nusser Z.** Novel subcellular distribution pattern of A-type  $K^+$  channels on neuronal surface. *J Neurosci* 26: 2684-2691, 2006.

**Konopacki J, MacIver MB, Bland BH, Roth SH.** Carbachol-induced EEG 'theta' activity in hippocampal brain slices. *Brain Res* 405: 196-198, 1987.

**Leung LW, Yim CY.** Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons *in vitro*. *Brain Res* 553: 261-274, 1991.

**Lien CC, Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Jonas P.** Gating, modulation and subunit composition of voltage-gated  $K(+)$  channels in dendritic inhibitory interneurons of rat hippocampus. *J Physiol* 538: 405-419, 2002.

**Locke RE, Nerbonne JM.** Three kinetically distinct  $Ca^{2+}$ -independent depolarization-activated  $K^+$  currents in callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 78: 2309-2320, 1997.

**Luthi A, McCormick DA.** Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of  $Ca^{2+}$ -mediated upregulation of  $I_h$ . *Neuron* 20: 553-563, 1998.

**Maccaferri G, McBain CJ.** The hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal *stratum oriens-alveus* interneurons. *J Physiol* 497 ( Pt 1): 119-130, 1996.

**MacVicar BA, Tse FW.** Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol* 417: 197-212, 1989.

**Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P.** Functional and molecular differences between voltage-gated  $K^+$  channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci* 18: 8111-8125, 1998.

**Mitchell SJ, Rawlins JN, Steward O, Olton DS.** Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *J Neurosci* 2: 292-302, 1982.

**Nunez A, Garcia-Austt E, Buno W, Jr.** Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res* 416: 289-300, 1987.

**Petsche H, Stumpf C, Gogolak G.** [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells.]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 14: 202-211, 1962.

**Rhodes KJ, Carroll KI, Sung MA, Doliveira LC, Monaghan MM, Burke SL, Strassle BW, Buchwalder L, Menegola M, Cao J, An WF, Trimmer JS.** KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci* 24: 7903-7915, 2004.

**Rudy B.** Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729-749, 1998.

**Serodio P, Rudy B.** Differential expression of Kv4 K<sup>+</sup> channel subunits mediating subthreshold transient K<sup>+</sup> (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* 79: 1081-1091, 1998.

**Serodio P, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 75: 2174-2179, 1996.

**Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, Jan LY.** Subcellular segregation of two A-type K<sup>+</sup> channel proteins in rat central neurons. *Neuron* 9: 271-284, 1992.

**Shi H, Wang HZ, Wang Z.** Extracellular Ba(2+) blocks the cardiac transient outward K(+) current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H295-299, 2000.

**Shibata R, Nakahira K, Shibasaki K, Wakazono Y, Imoto K, Ikenaka K.** A-type K<sup>+</sup> current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20: 4145-4155, 2000.

**Somogyi P, Klausberger T.** Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26, 2005.

**Song WJ.** Genes responsible for native depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in neurons. *Neurosci Res* 42: 7-14, 2002.

**Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ.** Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18: 3124-3137, 1998.

**Stoppini L, Buchs PA, Muller D.** A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182, 1991.

**Vinogradova OS.** Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol* 45: 523-583, 1995.

**Winson J.** Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201: 160-163, 1978.

**Yu SP, Kerchner GA.** Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 52: 612-617, 1998.

**Yuan W, Burkhalter A, Nerbonne JM.** Functional role of the fast transient outward K<sup>+</sup> current I<sub>A</sub> in pyramidal neurons in (rat) primary visual cortex. *J Neurosci* 25: 9185-9194, 2005.

**Zhang L, McBain CJ.** Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol* 488 (Pt 3): 661-672, 1995a.

**Zhang L, McBain CJ.** Voltage-gated potassium currents in *stratum oriens-alveus* inhibitory neurones of the rat CA1 hippocampus. *J Physiol* 488 ( Pt 3): 647-660, 1995b.

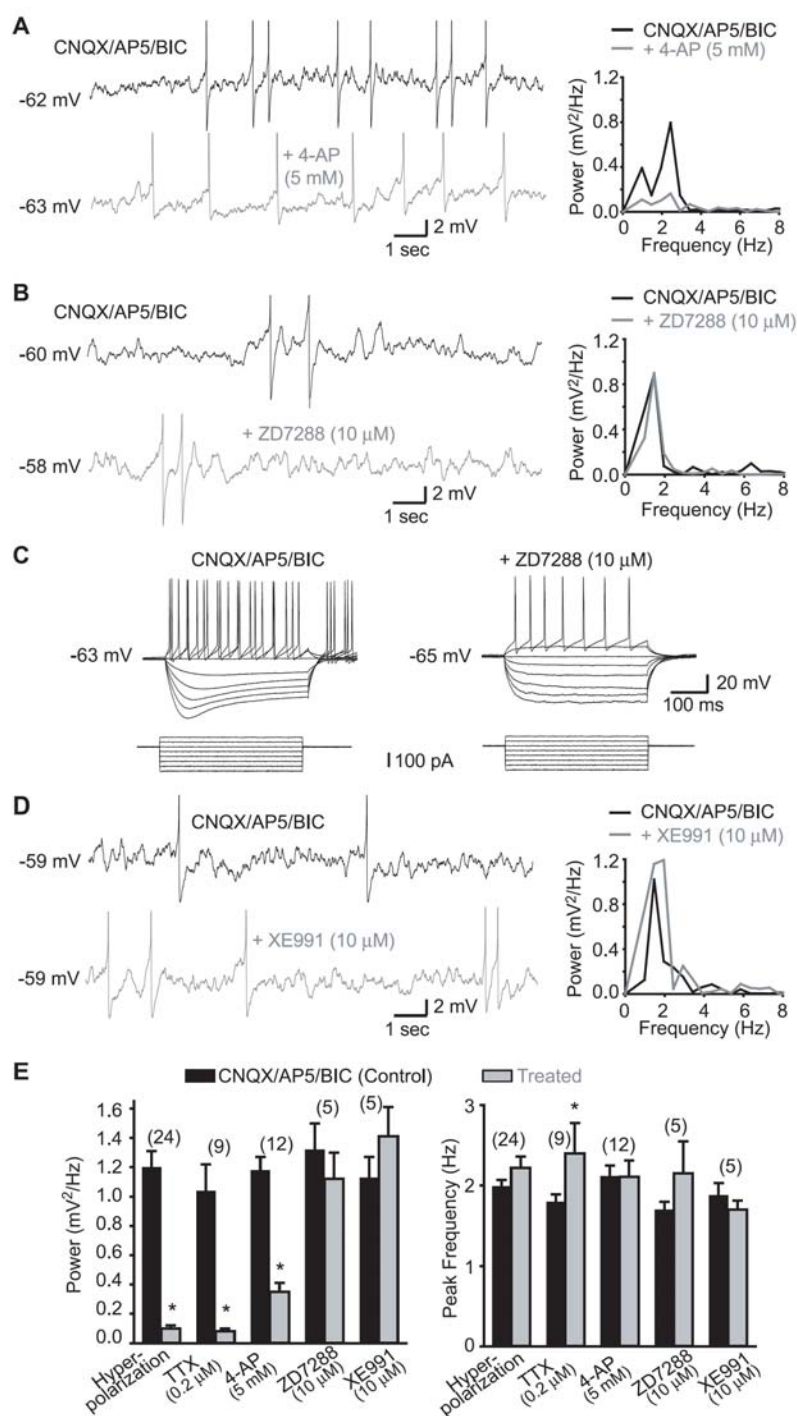
### 3.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Julie Pepin for excellent technical assistance. Plasmid constructs were kindly provided by M. Bouvier, J.M. Nerbonne and A. Shrier. The antibodies against somatostatin (#56) and cholecystokinin (#9303) were kindly provided by CURE/Digestive Diseases Research Center, RIA Core, NIH Grant #DK41301. This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MT-10848), Fonds de la recherche en santé du Québec (Groupe de recherche sur le système nerveux central) and the Canada Research Chair Program (J.-C.L.; Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology).

### 3.9 TABLES, FIGURES AND LEGENDS

**Table 1. Coexpression of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins and peptides with Kv4.3 in CA1 interneurons**

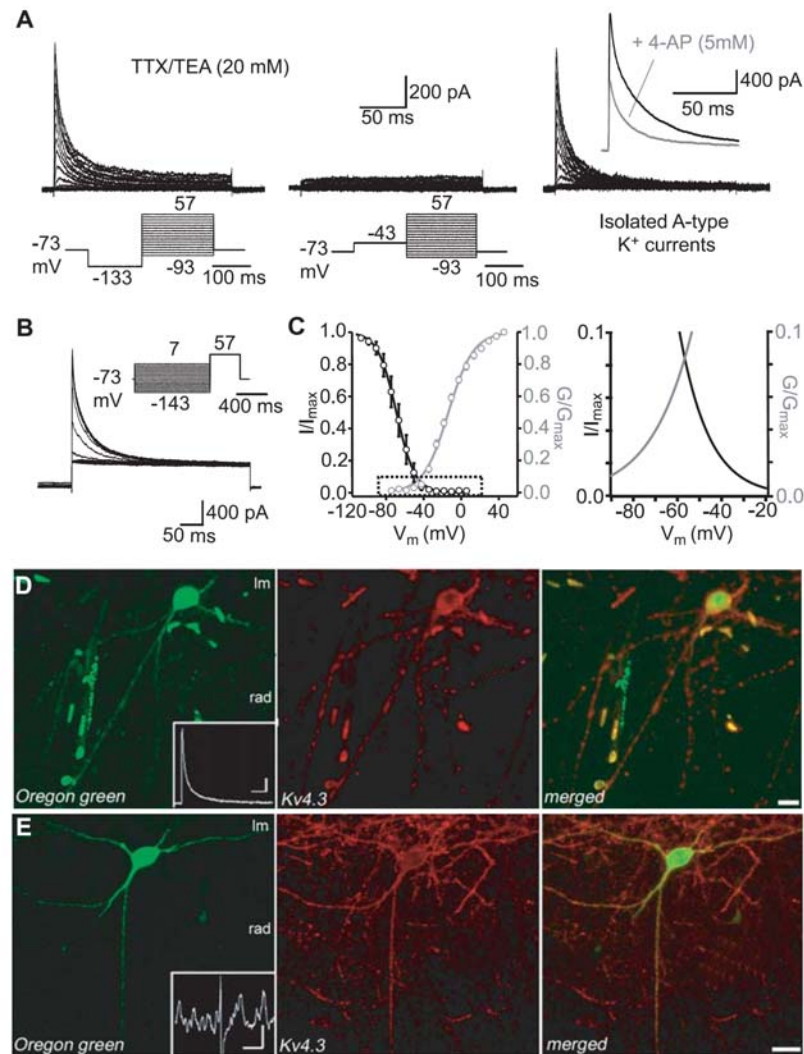
	Number of cells in layer / total				% coexpression with Kv4.3			
	O/A	Pyr	Rad	LM	O/A	Pyr	Rad	LM
Parvalbumin	3/84	81/84	0/84	0/84	0	12	0	0
Calbindin	5/31	10/31	6/31	10/31	20	20	50	70
Somatostatin	52/58	5/58	1/58	0/58	13	80	0	0
Cholecystokinin	5/28	4/28	3/28	16/28	0	25	33	88



**FIGURE 1. Membrane potential oscillations (MPOs) in LM/R interneurons in acute slices are dependent on 4-AP-sensitive  $K^+$  currents but not on  $I_h$  or  $I_M$**

*A*, MPOs from a representative interneuron (left) recorded at membrane potential near spike threshold in the presence of non-NMDA, NMDA and GABA<sub>A</sub> receptor antagonists

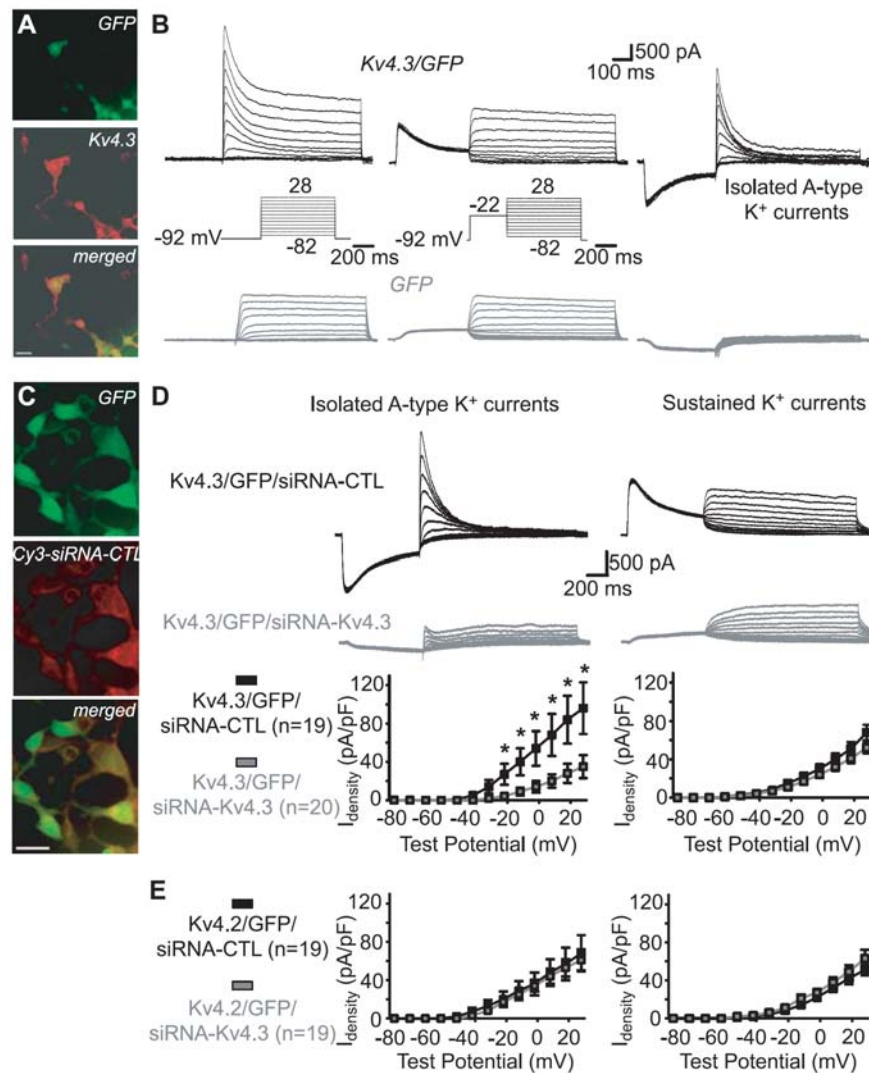
(CNQX, 20  $\mu$ M; AP5, 50  $\mu$ M; bicuculline (BIC), 25  $\mu$ M; top trace). In the same cell, MPOs are significantly reduced by application of 4-AP (5 mM; bottom trace). In this and other figures with traces showing MPOs, action potentials are truncated. Power spectra (right) of records from the same cell show the reduction of the power of MPOs by 4-AP. *B*, Similar data from another cell showing that MPOs recorded near spike threshold are not diminished by ZD7288, a blocker of the h-current ( $I_h$ ). *C*, Positive control experiments from the same cell as in (b) showing that the sag in the membrane response elicited by hyperpolarizing current injections and produced by  $I_h$  (control in CNQX/AP5/BIC, left panel) was blocked by ZD7288 (10  $\mu$ M; right panel). *D*, Representative traces from another interneuron showing that MPOs and corresponding power spectra are not reduced by XE991 (10  $\mu$ M), a selective blocker of muscarine-sensitive  $K^+$  current ( $I_M$ ). *E*, Summary bar graphs showing that the power of MPOs was significantly reduced by membrane hyperpolarization ( $V_m$  threshold -10 mV), TTX (0.2  $\mu$ M) and 4-AP (5 mM) but not by ZD7288 (10  $\mu$ M) or XE991 (10  $\mu$ M) while the peak frequency of MPOs was generally unchanged. \*,  $P < 0.05$ .



**FIGURE 2. Properties of A-type K<sup>+</sup> currents and expression of Kv4.3 in LM/R interneurons in acute slices**

A, K<sup>+</sup> currents were recorded from outside-out patches pulled from somata of interneurons in the presence of TTX (0.5  $\mu$ M) and TEA (20 mM). K<sup>+</sup> currents composed of rapidly inactivating and non-inactivating components were evoked by test pulses to potentials between -93 and 57 mV (200 ms) from a potential of -133 mV (150 ms) (left panel), while currents composed of only a non-inactivating component were evoked from a potential of -43 mV (middle panel). Digital subtraction resulted in the isolation of A-type K<sup>+</sup> currents (right panel) and inset shows reduction of A-type K<sup>+</sup> currents from another interneuron (elicited by a test pulses to 57 mV) by 5 mM 4-AP. B, Inactivation of A-type K<sup>+</sup> currents was studied by applying 1-sec pre-pulses between -143 and 7 mV followed by

a pulse to 57 mV (400 ms). *C*, Mean activation ( $n=14$ ) and inactivation ( $n=10$ ) curves of A-type  $K^+$  currents were fitted using a Boltzmann function (left). Boxed area is shown enlarged at right, illustrating the intersection of activation and inactivation curves, and window current near threshold. *D*, Confocal image of an oregon green-filled interneuron (left) from which A-type  $K^+$  currents were recorded in outside-out patch (inset; calibration 200 pA, 25 ms). Confocal image shows immunolabeling for Kv4.3 in the same section (middle) and indicates that the protein is found in the soma and dendritic compartments. Merged images (right) showing colocalization. *E*, Example of a different oregon green-labeled interneuron (left) which displayed MPOs during whole-cell recordings (inset; calibration 2 mV, 1 sec). This interneuron was also immunopositive for Kv4.3 (middle and right images). Scale bars: (*D*), 20  $\mu\text{m}$ ; (*E*), 10  $\mu\text{m}$ .

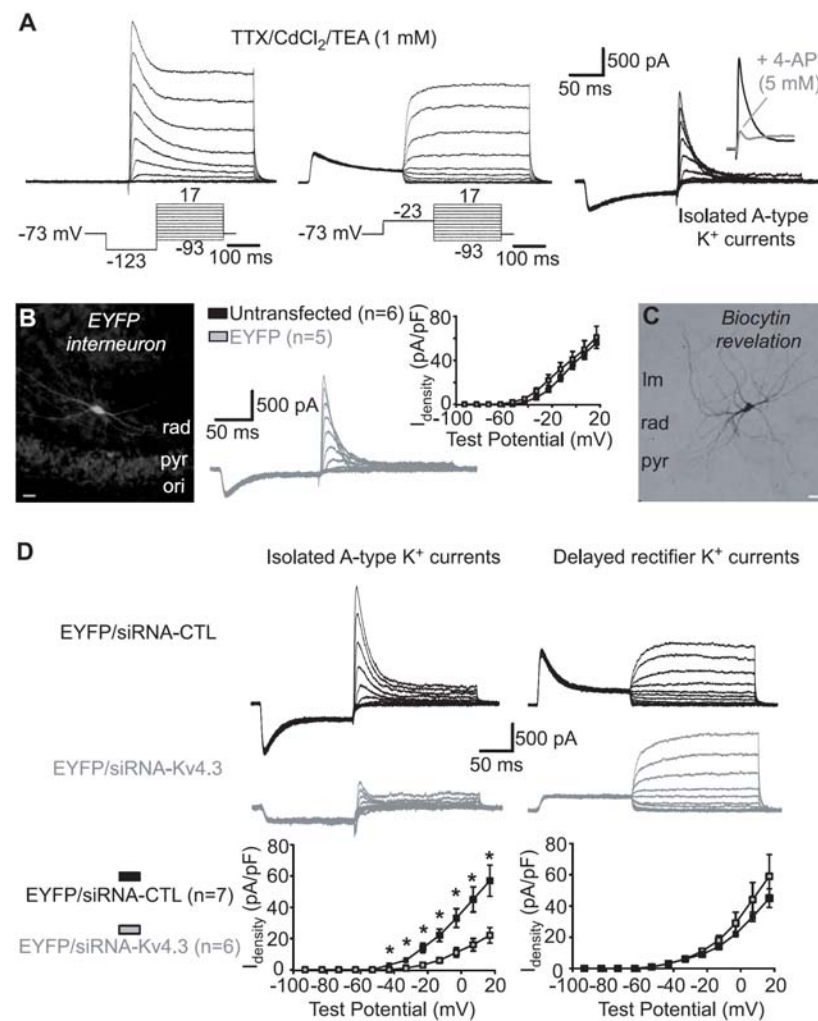


**FIGURE 3. Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents and functional knockdown by siRNA in HEK293 cells**

*A*, Fluorescence images showing that GFP-expressing cells cotransfected with Kv4.3 (top image) were immunopositive for Kv4.3 (middle and bottom images) (scale bar, 25  $\mu$ m). *B*, In cells cotransfected with Kv4.3 and GFP (top traces) prominent A-type K<sup>+</sup> currents were isolated (right) by subtracting the sustained K<sup>+</sup> currents elicited by voltage jumps from a depolarized potential (middle), from the total K<sup>+</sup> currents evoked by voltage steps from a hyperpolarized potential (left). A-type K<sup>+</sup> currents were absent in cells transfected with GFP only (bottom traces). *C*, Fluorescence images showing that GFP-expressing cells (top image), cotransfected with Kv4.3 and a cyanine3-tagged non-targeting control siRNA



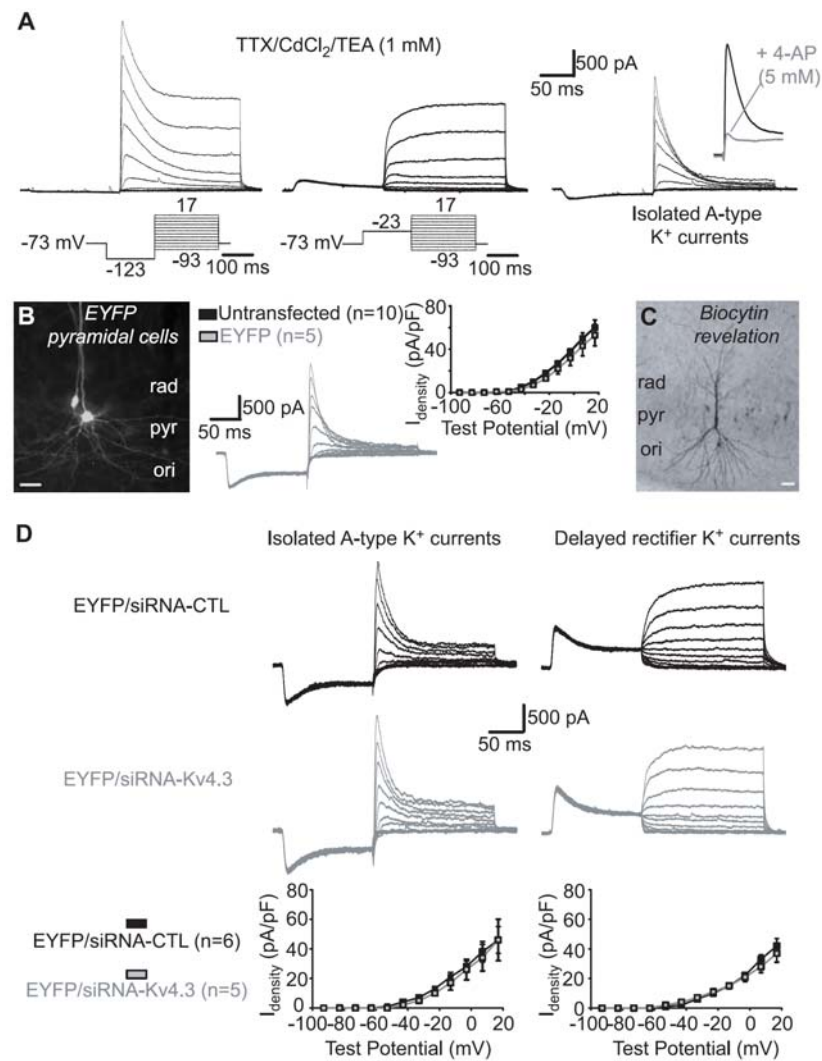
(Cy3-siRNA-CTL) colocalized the fluorescently-tagged siRNA (middle and bottom images) (scale bar, 25  $\mu$ m). *D*, Traces from representative cells (top and middle) and summary graphs for all cells (bottom; \*,  $P < 0.05$ ) illustrating that cotransfection of Kv4.3, GFP and a non-targeting control (siRNA-CTL) resulted in large A-type  $K^+$  currents while cotransfection of Kv4.3, GFP and siRNA targeting Kv4.3 (siRNA-Kv4.3) prevented expression of A-type  $K^+$  currents (left). In contrast, endogenous sustained  $K^+$  currents were not different in the same cells (right), indicating a selective functional knockdown of A-type currents. *E*, Summary graphs for all cells from control experiments with transfection of Kv4.2, showing that Kv4.2-mediated A-type  $K^+$  currents were similar in cells cotransfected with siRNA-CTL or siRNA-Kv4.3 (left). Sustained  $K^+$  currents were also similar in both groups (right), indicating a selective functional knockdown of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents.



**FIGURE 4. Kv4.3 siRNA reduces A-type K<sup>+</sup> currents in interneurons in slice cultures**

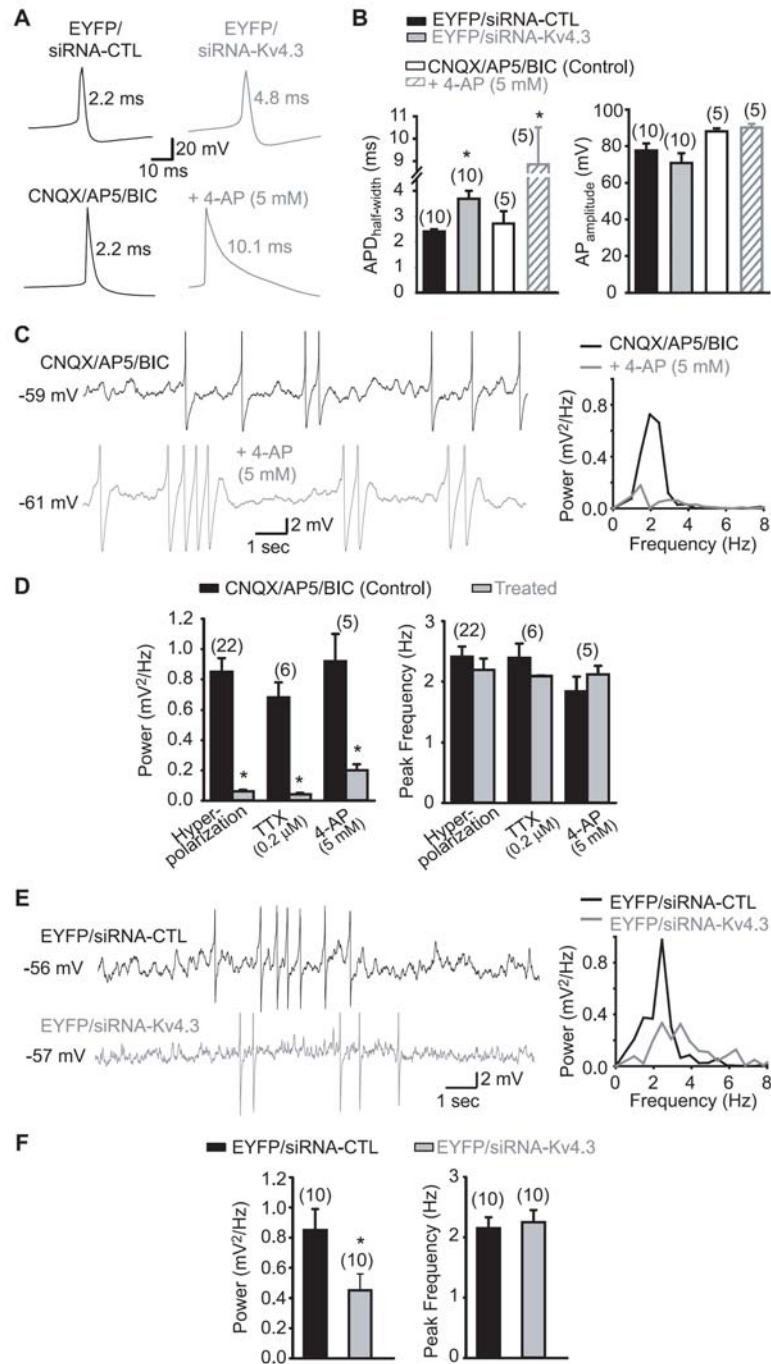
*A*, Whole-cell K<sup>+</sup> currents recorded from interneurons in TTX (1  $\mu$ M), CdCl<sub>2</sub> (150  $\mu$ M) and a low concentration of TEA (1 mM). Total K<sup>+</sup> currents activated by test pulses from a hyperpolarized potential consisted of rapidly inactivating and delayed components (left). Delayed rectifier K<sup>+</sup> currents evoked by test pulses from a depolarized potential (middle) were subtracted to isolate A-type K<sup>+</sup> currents (right). Inset shows sensitivity of A-type K<sup>+</sup> currents to 5 mM 4-AP. *B*, Fluorescence image of an EYFP-expressing LM/R interneuron (left, scale bar 25  $\mu$ m). Traces from a representative EYFP-expressing interneuron showing isolated A-type K<sup>+</sup> currents (middle). Summary graph (right), illustrating similar A-type K<sup>+</sup> current density in untransfected and EYFP-expressing interneurons. *C*, Example of biocytin labelling of an EYFP-expressing interneuron showing typical non-pyramidal

morphology of LM/R interneurons. *D*, Traces from representative interneurons (top) and summary graphs for all cells (bottom), indicating that transfection of Kv4.3 siRNA selectively reduced A-type K<sup>+</sup> current density (left) and did not affect delayed rectifier K<sup>+</sup> currents (right), in comparison to transfection with control siRNA.



**FIGURE 5. Kv4.3 siRNA did not affect A-type  $K^+$  currents in CA1 pyramidal cells in slice cultures**

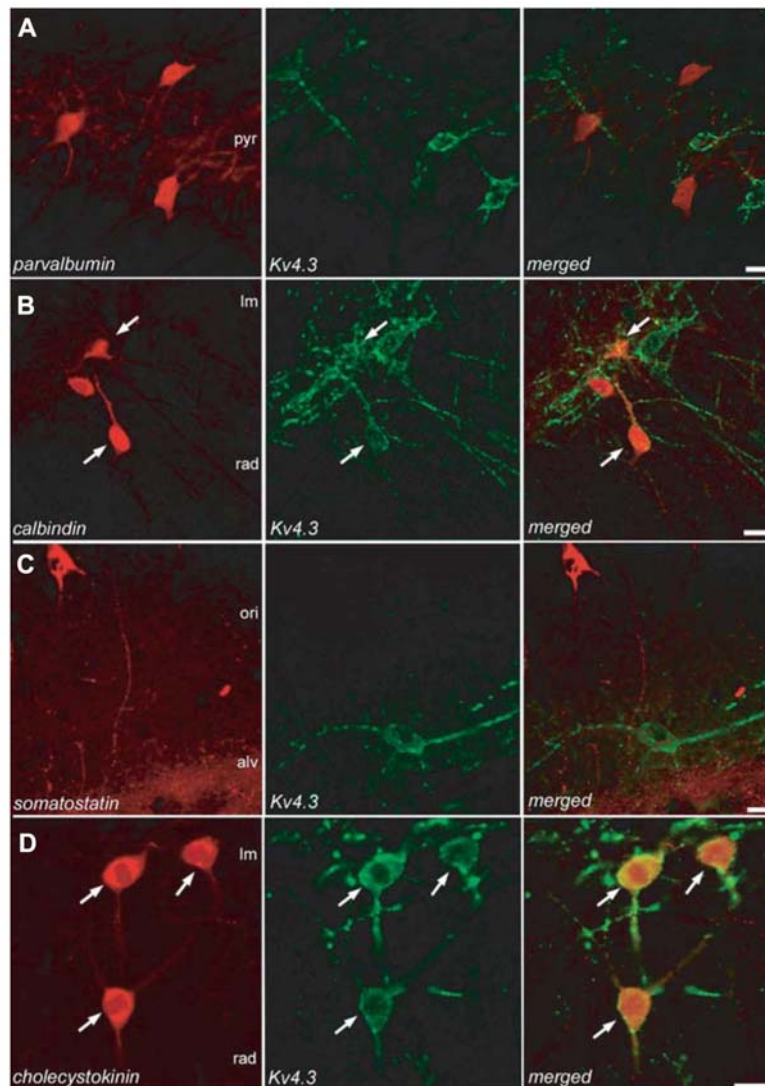
*A*, Total whole-cell  $K^+$  currents (left) were composed of rapidly inactivating A-type (right) and delayed rectifier (middle)  $K^+$  currents in pyramidal cells. A-type  $K^+$  currents were inhibited by 4-AP (inset). *B*, Fluorescence image of EYFP-expressing pyramidal cells (left, scale bar 25  $\mu$ m). Traces from a representative EYFP-expressing pyramidal cell (middle) and summary graph for all cells (right) showing similar A-type  $K^+$  current density in untransfected and EYFP-expressing pyramidal cells. *C*, Example of biocytin labelling of an EYFP-expressing pyramidal cell. *D*, Traces from representative pyramidal cells (top) and summary graphs (bottom) illustrating that A-type (left) and delayed rectifier (right)  $K^+$  current density were unchanged by Kv4.3 compared to control siRNA transfection.



**FIGURE 6. Kv4.3 siRNA broadens action potentials and inhibits MPOs in interneurons in slice cultures**

*A*, Representative traces of spontaneous action potentials in interneurons illustrating that Kv4.3 siRNA (top) and 4-AP (bottom) increase action potential duration. *B*, Summary bar graphs indicating that action potential duration at half-width ( $APD_{half-width}$ ) was

significantly increased by either Kv4.3 siRNA compared to control siRNA or by 5 mM 4-AP (left), while action potential amplitude was unaffected by Kv4.3 siRNA or by 4-AP (right) (\*,  $P < 0.05$ ). *C*, Representative traces (in presence of CNQX, AP5 and bicuculline) and corresponding power spectra for the same cell illustrating MPOs and the inhibitory effect of the  $K^+$  channel blocker 4-AP (5 mM). *D*, Summary bar graphs indicating that the power (left) but not the peak frequency (right) of MPOs is reduced by hyperpolarization, TTX and 4-AP, (\*,  $P < 0.05$ ). *E*, Representative traces and corresponding power spectra for the same cells showing that MPOs are decreased in interneurons transfected with Kv4.3 siRNA (bottom) compared to interneurons transfected with control siRNA (top). *F*, Summary bar graphs demonstrating the significant reduction in MPO power (left) and unchanged peak frequency (right) by Kv4.3 siRNA compared to the control siRNA (\*,  $P < 0.05$ ).



**FIGURE 7. Specific subpopulations of CA1 interneurons coexpressing Kv4.3 and  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins or peptides**

*A*, Confocal image of parvalbumin-immunopositive interneurons located in *stratum pyramidale* (pyr, left). Confocal image of immunolabeling for Kv4.3 in the same section (middle) and the merged images (right) indicate that parvalbumin-positive interneurons mostly did not colocalize Kv4.3. *B*, Calbindin-positive neurons (left) in *stratum radiatum* (rad) and *lacunosum-moleculare* (lm) often colocalized Kv4.3 (middle and right). Arrows point to double-labeled interneurons. *C*, Somatostatin-positive interneurons (left) in *stratum oriens* (ori) and *alveus* (alv) mostly did not colocalize Kv4.3 (middle and right). *D*, Cholecystikinin-immunopositive interneurons in *stratum radiatum* and *lacunosum-moleculare* (left) highly colocalized Kv4.3 (middle and right). (Scale bars, 15  $\mu\text{m}$ ).

# Supplemental Table 1. Properties of CA1 neurons with whole-cell recordings in hippocampal acute and cultured slices

**Supplemental Table 1** Properties of CA1 neurons with whole-cell recordings in hippocampal acute and cultured slices.

	<i>Untransfected</i>		<i>Transfected</i>		
	Acute slices	Cultured slices	EYFP	EYFP/siRNA-CTL	EYFP/siRNA-Kv4.3
<b>LM/R interneurons</b>					
Capacitance (pF)	26.4±1.4 (31)	24.4±1.1 (28)	22.5±2.0 (12)	20.6±1.2 (17)	21.6±1.3 (15)
Input resistance (MΩ)	293.1±19.1 (31)	191.2±13.6 (28) *	218.3±27.6 (12)	187.8±26.6 (17)	186.2±23.7 (15)
Resting membrane potential (mV)	-69.4±0.6 (31)	-68.4±0.7 (28)	-68.4±1.7 (12)	-71.3±1.5 (16)	-69.8±1.3 (15)
<b>K<sup>+</sup> currents<sup>a</sup></b>					
A-type I <sub>density</sub> (pA/pF)	69.3±10.6 (7)	56.1±4.3 (6)	60.7±10.1 (5)	57.3±10.4 (7)	21.8±4.6 (6) #†
5 mM 4-AP inhibition (%)	48.5±7.0 (6)	60.2±7.4 (4)	-	-	-
Delayed I <sub>density</sub> (pA/pF)	86.6±13.7 (7)	57.9±5.9 (6)	45.1±9.8 (5)	44.7±6.3 (7)	58.8±13.9 (6)
<b>Membrane potential oscillations<sup>b</sup></b>					
Recording potential (mV)	-63.8±0.4 (24)	-55.3±1.0 (22) *	-55.3±1.0 (7)	-55.4±1.5 (10)	-53.5±1.5 (10)
Power (mV <sup>2</sup> /Hz)	1.20±0.11 (24)	0.84±0.09 (22) *	1.00±0.19 (7)	0.85±0.14 (10)	0.45±0.11 (10) #†
Peak Frequency (Hz)	1.99±0.08 (24)	2.44±0.17 (22) *	2.4±0.5 (7)	2.2±0.2 (10)	2.3±0.2 (10)
<b>Action potential properties<sup>b, c</sup></b>					
Threshold (mV) <sup>c</sup>	-	-46.8±1.2 (22)	-45.7±1.3 (7)	-46.2±1.7 (10)	-45.4±1.8 (10)
Amplitude (mV) <sup>d</sup>	-	79.7±2.4 (22)	78.9±4.3 (7)	77.6±3.9 (10)	70.8±5.3 (10)
Duration (half-width) (ms)	-	2.55±0.25 (22)	2.88±0.23 (7)	2.39±0.11 (10)	3.68±0.26 (10) #†
AHP amplitude (mV)	-	14.4±0.9 (22)	17.0±2.3 (7)	17.0±1.8 (10)	15.4±1.7 (10)
<b>Pyramidal cells</b>					
<b>K<sup>+</sup> currents<sup>a</sup></b>					
A-type I <sub>density</sub> (pA/pF)	-	59.0±6.8 (10)	52.7±10.3 (5)	45.9±8.6 (6)	46.2±14.2 (5)
Delayed I <sub>density</sub> (pA/pF)	-	52.3±5.7 (10)	33.0±6.7 (5)	41.5±2.2 (6)	37.3±6.1 (5)

**a** Voltage-clamp recordings made in TTX/CdCl<sub>2</sub>/low TEA, except for experiments with 4-AP using 20 mM TEA. Currents obtained with test pulses to +17 mV.

**b** Current-clamp recordings in CNQX/AP5/BIC.

**c** Measured at the start of the rising phase.

**d** Measured from baseline.

Significantly different (\*) from acute slices, P<0.05.

Significantly different from EYFP (#) or EYFP/siRNA-CTL (†), P<0.05.



## **CHAPITRE IV. SECONDE SECTION DE RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

---

### **4.1 PREAMBULE**

Ce chapitre comporte l'article intitulé :

#### **« KChIP1 MODULATION OF Kv4.3-MEDIATED A-TYPE K<sup>+</sup> CURRENTS AND REPETITIVE FIRING IN HIPPOCAMPAL INTERNEURONS »**

Par Mathieu L. Bourdeau, Isabel Laplante, Charles E. Laurent & Jean-Claude Lacaille ; en préparation pour soumission à la revue *Neuroscience*.

### **4.2 ABSTRACT**

Neuronal A-type K<sup>+</sup> channels regulate action potential waveform, back-propagation and firing frequency. In hippocampal CA1 interneurons located at the *stratum lacunosum-moleculare/radiatum* junction (LM/RAD), Kv4.3 mediates A-type K<sup>+</sup> currents and a Kv4  $\beta$ -subunit of the Kv Channel Interacting Protein (KChIP) family, KChIP1, appears specifically expressed in these cells. However, the functional role of this accessory subunit in A-type K<sup>+</sup> currents and interneuron excitability remains largely unknown. Thus, we first studied KChIP1 and Kv4.3 channel interactions in HEK293 cells and found that KChIP1 co-expression increased Kv4.3 membrane localization and modulated A-type currents (increased current density, faster recovery from inactivation, leftward shift of activation curve, faster rise time and slower decay). These effects were dependent on functional Ca<sup>2+</sup> binding domains of KChIP1 and N-terminal region of Kv4.3. Next, we evaluated the effects of KChIP1 downregulation by siRNA on A-type K<sup>+</sup> currents in LM/RAD interneurons in slice cultures. Recovery from inactivation of A-type K<sup>+</sup> currents was slower after KChIP1 downregulation but other properties were unchanged. In addition, inhibition of KChIP1 levels did not affect individual action potential waveform and firing, but increased firing frequency during suprathreshold depolarizations, indicating that KChIP1 regulates interneuron cellular excitability. The effects of KChIP1 downregulation

were cell-specific since CA1 pyramidal cells that do not express KChIP1 were unaffected. Overall, our findings suggest that KChIP1 interacts with Kv4.3 in LM/RAD interneurons, enabling faster recovery from inactivation of A-type currents and thus promoting stronger inhibitory control of firing during sustained activity.

### 4.3 INTRODUCTION

Channels underlying neuronal A-type  $K^+$  currents (also known as  $I_A$ ,  $I_{SA}$  or A-currents) exhibit characteristic biophysical properties like rapid inactivation, fast recovery from inactivation and subthreshold activation (Coetzee et al. 1999; Birnbaum et al. 2004; Jerng et al. 2004a) and, thus, shape action potential waveform, regulate the latency of first spike during depolarization, control back-propagating action potentials and regulate firing frequency (Connor & Stevens 1971a; Hoffman et al. 1997; Shibata et al. 2000; Malin & Nerbonne 2001; Jerng et al. 2004a).

Evidence from recombinant and native cells suggests that Kv4  $\alpha$ -subunits underlie somatodendritic A-type  $K^+$  currents in neurons (Serodio et al. 1996; Serodio & Rudy 1998; Rhodes et al. 2004; Jerng et al. 2004a; Kim et al. 2005; Bourdeau et al. 2007). Heterologous expression of Kv4 leads to transient  $K^+$  currents resembling native A-type currents. However, Kv4 subunits alone cannot completely recapitulate the properties of native neuronal A-type  $K^+$  currents which led to the proposal that additional auxiliary Kv4  $\beta$ -subunits might modulate A-type currents in native cells (Birnbaum et al. 2004; Jerng et al. 2004a; Maffie & Rudy 2008). Kv Channel Interacting Proteins (KChIPs), a family of Kv4 accessory subunits comprising four members (KChIP1-4), have been identified as potential modulatory subunits of recombinant Kv4 and native A-type  $K^+$  channels (An et al. 2000). In heterologous systems, KChIPs typically enhance Kv4 membrane targeting and current density, accelerate the rate of recovery from inactivation of Kv4 currents and modulate their voltage-dependence. Thus, Kv4/KChIP currents exhibit properties approaching those of native A-type currents (An et al. 2000; Jerng et al. 2004a). KChIP subunits are members of the Neuronal Calcium Sensor (NCS) family and possess three functional EF-hand  $Ca^{2+}$  binding motifs which are critical for efficient heterologous

Kv4/KChIP interactions (An et al. 2000; Zhou et al. 2004; Pioletti et al. 2006; Burgoyne 2007). In addition, the N-terminus of Kv4 subunits is important for Kv4/KChIP interactions (Bähring et al. 2001; Scannevin et al. 2004; Pioletti et al. 2006; Wang et al. 2007). Recent X-ray crystallographic evidence revealed the three-dimensional structure of human Kv4.3<sub>6-145</sub>/human KChIP1<sub>38-217</sub> complex (Wang et al. 2007) and of rat Kv4.3<sub>1-143</sub>/human KChIP1(K160A-K167A)<sub>37-216</sub> complex (Pioletti et al. 2006). These structural data along with electrophysiological analysis of K<sup>+</sup> currents after co-expression of mutated Kv4.3 and KChIP1 proteins (Wang et al. 2007) pointed to important sites in Kv4.3 N-terminal region for efficient Kv4.3/KChIP1 interactions.

Few investigations assessed directly the role of KChIP accessory proteins on native A-type K<sup>+</sup> currents and cellular function. In cardiomyocytes, a defect in KChIP2 resulted in a complete loss of I<sub>to</sub> currents (A-type current equivalent) and enhanced cell firing (Kuo et al. 2001). In dopaminergic *substantia nigra* neurons, Kv4.3 and KChIP3 mRNA abundance was linked to A-type K<sup>+</sup> current density and control of firing frequency (Liss et al. 2001). Lastly, KChIP3 knockout induced a moderate reduction in A-type current amplitude in hippocampal granule cells and resulted in greater long-term potentiation (LTP) at the perforant path synapses (Lilliehook et al. 2003).

We recently showed that Kv4.3  $\alpha$ -subunits underlie A-type K<sup>+</sup> currents and play a key role in generation of subthreshold membrane potential oscillations (MPOs) in hippocampal CA1 interneurons located at the junction of *stratum lacunosum-moleculare* and *radiatum* (LM/RAD) (Bourdeau et al. 2007). Immunocytochemical evidence revealed that, in CA1 hippocampus, KChIP1 is preferentially expressed in interneurons (Rhodes et al. 2004; Menegola et al. 2008). Despite this large body of evidence, the functional role of Kv4  $\beta$ -subunits has not been examined in inhibitory interneurons. Therefore in the present study, we first characterized KChIP1 and Kv4.3 interactions in recombinant cells and secondly used siRNA to downregulate KChIP1 expression in LM/RAD interneurons and assess its contribution to native A-type current properties and cellular excitability. Our results reveal a role for KChIP1 in modulation of recovery from inactivation of A-type K<sup>+</sup> currents and repetitive firing in hippocampal interneurons.

## 4.4 MATERIALS AND METHODS

### 4.4.1 ORGANOTYPIC HIPPOCAMPAL SLICE AND HEK293 CELL CULTURES

Animal procedures conformed to the animal welfare guidelines at Université de Montréal. Organotypic hippocampal slice cultures were prepared and maintained as described previously (Bourdeau et al. 2007) from Sprague-Dawley (P7-P8) rats (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) and used for experiments after 5-8 days in culture. Human embryonic kidney cells (HEK293; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% foetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 1 mM L-glutamine (Wisent, St-Bruno, Montreal, Canada) and maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. For recording experiments, HEK293 cells were seeded onto glass coverslips placed in 35 mm culture dishes containing DMEM, one day prior to transfection.

### 4.4.2 CONSTRUCTS, siRNAs AND TRANSFECTIONS

pEYFP-C1 (YFP) was obtained from Clontech Laboratories (Mountain View, CA). GFP and rat Kv4.3 constructs were previously described (Bourdeau et al. 2007). The pBK-CMV-rKv4.3Δ2-12 (Kv4.3Δ2-12) truncation mutant construct was obtained by amplifying a partial Kv4.3 sequence by PCR with primers containing restriction sites (underlined) and cloned into pBK-CMV plasmid. Sense primer was 5'-A.A.A.A.G.A.T.C.T.A.T.G.C.G.G.G.G.C.T.G.C.-3' (BglIII) and antisense 5'-G.C.G.G.A.A.T.T.C.T.T.A.C.A.A.G.G.C.A.G.-3' (EcoRI). The human KChIP1 construct with the EYFP tag (KChIP1-YFP) and the human triple EF-hand KChIP1 mutant construct with the EYFP tag (KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP) were kindly provided by Dr. R.D. Burgoyne (University of Liverpool, UK) (O'Callaghan et al. 2003; Hasdemir et al. 2005). All siRNAs were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Commercial siCONTROL™ (siRNA-CTL) was used as non-targeting control siRNA. KChIP1 siRNA (siRNA-KChIP1) was designed using rat KChIP1 sequence (Accession no. AY082658) and targets DNA sequence ACATCAATAAAGACGGCTA.

HEK293 cells were transfected using Eugene 6 (Roche, Basel, Switzerland) following manufacturer's instructions. Co-transfections were completed as follows: 1.8 µg Kv4.3 or Kv4.3Δ2-12 cDNA and 0.2 µg of either GFP, KChIP1-YFP or KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP cDNA. Cells were then incubated for 48-72 hours before recordings. Biolistic transfections of neurons in organotypic slice cultures (between 4-6 days in culture) were made using a Helios Gene Gun (Bio-Rad, Hercules, CA) following manufacturer's instructions. Gold beads (1.6 µm) were coated with 50 µg YFP cDNA and 160 µl of 20 µM duplex siRNA. Transfected slices were used 48 hours after transfection. Cells expressing fluorescent proteins were selected for recordings with an epifluorescence Fluoarc system (Zeiss).

#### 4.4.3 ELECTROPHYSIOLOGY

Cells were viewed with an upright microscope (Axioskop; Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with Hoffmann optics (Modulation Optics, NY), a long-range water immersion objective (40X) and an infrared video camera (model 6500; Cohu, San Diego, CA). In the CA1 hippocampal region, interneurons located at the border of *strata lacunosum-moleculare* and *radiatum* (LM/RAD), or pyramidal cells situated in *stratum pyramidale* were visually identified for recordings. All recordings were made at room temperature (20-22°C) using an Axopatch 200B or a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, Foster City, CA). Signals were filtered at 2 kHz (8-pole Bessel filter) and digitized at 10 kHz on a Pentium based computer using pClamp 9.0 or 10.0 (Molecular Devices). Whole-cell voltage-clamp recordings from neurons were made in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 23 glucose and 0.04 Trolox (≈ 310 mOsm) and saturated with 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Patch pipettes (World Precision Instruments; Sarasota, FL; 1.0 mm OD, 4-7 MΩ) were filled with solution containing (in mM): 120 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 glutathione, 2 ATP-Tris, 0.4 GTP-Tris and 0.1% biocytin (≈ 300 mOsm). Recordings from HEK293 cells were made using an extracellular solution containing (in mM): 150 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 25 glucose (330 mOsm) and pipettes (OD 1.2 mm, 2-5 MΩ) were filled with (in mM): 140 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 10 HEPES and 2 ATP (315 mOsm). After achieving the whole-cell configuration, leakage and capacitive currents were subtracted on-line using a P/4 procedure. Series resistance

was in the range of 5-15 M $\Omega$  and compensated by 40-60% during voltage-clamp recordings. Liquid junction potentials were corrected (13 mV for neuron recordings and 12 mV for HEK293 cell recordings). A-type K<sup>+</sup> currents were isolated using voltage step protocols, digital subtractions and, in neurons, channel blockers (Lien et al. 2002; Bourdeau et al. 2007). For study of A-type current recovery from inactivation, paired-pulse protocols were used and A-type K<sup>+</sup> currents were separated from non-inactivating sustained K<sup>+</sup> currents by setting baseline as the K<sup>+</sup> current amplitude at the end of the second test pulse ( $I_2$ ) at the shortest inter-pulse interval (illustrated by dotted lines in Figs. 3A and 6C). Activation curves were obtained as previously described (Bourdeau et al. 2007) using a Boltzmann function of the form:  $g/g_{\max} = (1 + \exp(-(V - V_{1/2})/k))^{-1}$ , where  $g/g_{\max}$  is the conductance normalized to its maximal value,  $V$  is the membrane potential,  $V_{1/2}$  is the membrane voltage at which the current amplitude is half-maximal, and  $k$  is the slope factor. Inactivation data were fitted with the following Boltzmann function:  $I/I_{\max} = (1 + \exp((V - V_{1/2})/k))^{-1}$ , where  $I/I_{\max}$  is the current normalized to its maximal value.

Whole-cell current-clamp recordings were made in ACSF containing (in mM): 124 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgSO<sub>4</sub>, 10 glucose and 0.04 Trolox ( $\approx$  305 mOsm). Recording pipettes (1.0 mm OD, 4-7 M $\Omega$ ) were filled with (in mM): 140 K-gluconate, 5 NaCl, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP-Tris, 0.4 GTP-Tris and 0.1% biocytin (285 mOsm, pH 7.2-7.3). Antagonists of non-NMDA (DNQX, 25  $\mu$ M), NMDA (AP5, 50  $\mu$ M) and GABA<sub>A</sub> (Gabazine, 5  $\mu$ M) receptors were applied. The liquid junction potential was 14 mV and was corrected. Neuronal firing was studied by maintaining cells at -74 mV and by applying 1-sec depolarizing current injections between 10 and 200 pA. The instantaneous frequency of a given action potential was calculated as the inverse of the interspike interval (ISI) between that spike and the one preceding it (Gu et al. 2008). Properties of the first action potentials initiated during 1-sec 200 pA depolarizing current steps were analysed. Action potential threshold was the potential at the start of the rising phase. Amplitude was measured from baseline (-74 mV). Duration was measured at 50 % of amplitude (half-width). The afterhyperpolarization (AHP) amplitude was determined from threshold. For membrane potential oscillation (MPO) recordings, steady current injection was used to hold membrane potential at a near threshold level with occasional

spontaneous action potentials. Segments of membrane potential were analysed with spectral analysis as previously described (Chapman & Lacaille 1999b; Bourdeau et al. 2007). All drugs were purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada), except tetrodotoxin (TTX) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel).

#### **4.4.4 IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND IMAGE ANALYSIS**

Immunohistochemical detection of KChIP1 was achieved in slice cultures fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (4°C, overnight). Afterwards, slices were cryoprotected in 30% sucrose and resectioned (50 µm-thick) using a freezing microtome (Leica SM2000R, Nussloch, Germany). Sections were treated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min), permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.05M Tris buffer saline (TBS pH 7.4-7.6; 15 min), blocked in 10% normal goat serum (30 min) and incubated overnight at room temperature with mouse monoclonal anti-KChIP1 (1:100, Neuromab, Davis, CA). Sections were subsequently incubated in biotinylated goat anti-mouse IgGs (1:200, 1 h; Vector Laboratories, Burlingame, CA), and then in the avidin-biotin complex (1:200, 1 h; Elite ABC kit; Vector Laboratories). The reaction product was visualized using 0.05% 3'-diaminobenzidine, 0.2% nickel sulphate, 0.1 M imidazole and 0.0015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS. Sections were rinsed thoroughly between incubations. A similar protocol was used for detection of Kv4.3 and Kv4.3Δ2-12 in transfected HEK293 cells using mouse monoclonal anti-Kv4.3 (1:1000; Neuromab) and rabbit polyclonal anti-Kv4.3 (1:1000; Millipore, Temacula, CA). Immunolabelling was revealed using biotinylated goat anti-mouse (1:200; Vector Laboratories) or biotinylated goat anti-rabbit (1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, CA) secondary antibodies, the avidin-biotin complex (Elite ABC kit; 1:200; Vector Laboratories) and Texas Red-conjugated streptavidin (1:200; Jackson ImmunoResearch). Hippocampal sections and HEK293 cells were mounted in the Prolong Antifade kit (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada).

Images of labelled neurons in hippocampal slice cultures were obtained with an Eclipse E600 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a Retiga 1300 camera (Q-Imaging, Canada) and processed in Photoshop 7.0 (Adobe, San Jose, CA). Images of HEK293 cells were obtained with a Zeiss LSM 510 confocal microscope system (Axioskop; Coherent,

Santa Clara, CA) and analysed with LSM Image Browser software (Zeiss). For fluorescence quantification, a line was positioned across the fluorescent cell (avoiding the nucleus). The relative amount of fluorescence localised at the plasma membrane was estimated by measuring the ratio of membrane-to-cytosol fluorescence:  $F_m / F_c = (F_{m [1]} + F_{m [2]}) / (F_{c [3]} + F_{c [4]})$ , obtained from two measures of fluorescence intensity at membrane sites (start (0%) and end (100%) of the line crossing the cell) and two measures at cytosolic sites (25% and 75% distance of the portion of the traced line crossing the cell) were used.

#### 4.4.5 WESTERN BLOTTING

Transfected slice cultures were lysed with buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 mM NaF, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) containing protease inhibitors (Inhibitor Cocktail Set I from Calbiochem, San Diego, CA) and passed through a 26G needle. Lysates were centrifuged (19000g, 20 min, 4°C) and the resulting supernatant was evaluated for protein content using BCA assay (Pierce, Rockford, IL). Protein extracts (25 µg) were resolved by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. Immunoblotting was performed using KChIP1 antibody (1:10; overnight at 4°C; Neuromab). Immunoreactive bands were detected using a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgGs (1:3000; GE Healthcare, Baie d'Urfe, Quebec, Canada) followed by ECL detection (Perkin-Elmer Life Science, Waltham, MA). Immunoreactive bands were scanned with a desktop scanner and densitometric analysis was done using Quantity One software (Bio-Rad). To verify specificity of siRNA-KChIP1 transfections, membranes were stripped with a 0.2 M glycine pH 2.2- 1% SDS solution and probed with mouse monoclonal KChIP2 antibody (1:10; overnight at 4°C; Neuromab). KChIP signals were normalized to ERK1/2 protein levels obtained after a subsequent strip, using the rabbit polyclonal ERK1/2 antibody (1:20000; Santa Cruz Biotechnology, Delaware, CA).



#### 4.4.6 STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (s.e.m.). Statistical comparisons between experimental groups were made using unpaired Student's t-tests (two-tailed). Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 4.5 RESULTS

#### 4.5.1 KChIP1 EXPRESSION IN LM/RAD INTERNEURONS

Kv4.3 channels mediate A-type  $K^+$  currents in LM/RAD interneurons (Bourdeau et al. 2007) and KChIP1 is preferentially expressed in hippocampal inhibitory interneurons (Rhodes et al. 2004; Menegola et al. 2008). Thus, first we performed immunolabelling with a KChIP1-specific antibody to establish the presence of KChIP1 in interneurons in hippocampal slice cultures. We found KChIP1 staining in the somatodendritic compartment of many multipolar interneurons, including in CA1 interneurons at the border between *strata lacunosum-moleculare* and *radiatum* (**Fig. 1**). This pattern of distribution is comparable to those reported for KChIP1 in adult rat hippocampus (Rhodes et al. 2004; Menegola et al. 2008). Thus, LM/RAD interneurons in slice cultures exhibit somatodendritic KChIP1 staining, suggesting that KChIP1 could act as a potential modulator of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents and function in these cells.

#### 4.5.2 RECOMBINANT Kv4.3 MODULATION BY $\beta$ -SUBUNIT KChIP1

Before addressing KChIP1 modulation of native Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents in interneurons, we characterized the modulation of Kv4.3  $K^+$  currents by the  $\beta$ -subunit KChIP1 in an expression system. We examined the effect of KChIP1 on Kv4.3 current density ( $I_{\text{density}}$ ) by performing whole-cell voltage-clamp recordings from transiently transfected HEK293 cells. Following co-transfection of rat Kv4.3 and GFP (control group), we recorded  $K^+$  currents from GFP-positive cells. We isolated the Kv4.3-mediated transient A-type  $K^+$  currents (**Fig. 2A**) by subtraction of the sustained  $K^+$  currents (evoked by voltage steps preceded by a depolarizing prepulse) from the total outward  $K^+$  currents (evoked by voltage steps without depolarizing prepulse) (Bourdeau et al. 2007). When a

YFP-tagged KChIP1 cDNA (KChIP1-YFP) (O'Callaghan et al. 2003) was co-transfected with Kv4.3, the density of the A-type current ( $I_{\text{density}}$ ) was significantly increased (at + 28 mV,  $353.9 \pm 66.2$  % of control;  $n = 13$ ,  $P < 0.05$ ) compared to the Kv4.3/GFP control group ( $n = 10$ ) (**Fig. 2B**). In contrast, a mutant construct of KChIP1 (KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP), with three of the four EF-hand domains mutated to render the protein unable to bind calcium *in vitro* (An et al. 2000; Hasdemir et al. 2005), failed to increase the  $I_{\text{density}}$  of Kv4.3 currents (at + 28 mV,  $113.8 \pm 26.4$  % of control;  $n = 13$ ) (**Fig. 2B**). Thus, our results indicate that, in expression system, KChIP1 enhances Kv4.3-mediated A-type current levels and that the integrity of KChIP1 EF-hand domains is critical for this process.

Since KChIP1 may enhance membrane targeting of Kv4.3 (Hatano et al. 2002), we next analysed the impact of KChIP1-YFP or KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP expression on the subcellular immunolocalization of Kv4.3 using confocal microscopy. In HEK293 cells expressing Kv4.3 and GFP, we observed immunolabelling of Kv4.3 at the plasma membrane, as well as diffuse cytoplasmic labelling (**Fig. 2C,F**). When Kv4.3 was co-transfected with KChIP1-YFP, we found that the ratio of membrane-to-cytosol Kv4.3 immunofluorescence was increased (**Fig. 2D,F**). Furthermore, when the mutant KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP was co-expressed with Kv4.3, the membrane-to-cytosol Kv4.3 immunofluorescence ratio was not different from that in HEK293 cells without KChIP1 (**Fig. 2E,F**). Similarly, in HEK293 cells expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP, the membrane-to-cytosol ratio of YFP fluorescence was significantly greater than that in cells co-expressing Kv4.3 and the mutated KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP (**Fig. 2D-F**), or than that of GFP in cells expressing Kv4.3 with GFP (**Fig. 2C,F**). Therefore, these results suggest that KChIP1 increases Kv4.3 membrane localization in our recombinant system and this modulation of Kv4.3 subcellular localization requires functional  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domains of KChIP1.

Since KChIP1 can modulate biophysical properties of Kv4.3 currents (An et al. 2000) we studied next the impact of KChIP1 co-expression on the biophysical characteristics of heterologous Kv4.3 currents. First, Kv4.3-mediated A-type  $\text{K}^+$  currents recorded in HEK293 cells co-expressing KChIP1-YFP showed a faster recovery from inactivation, starting at inter-pulse interval (IPI) of 55 ms (**Fig. 3A,B**), compared to Kv4.3/GFP cells.

The time constant of recovery from inactivation (obtained from mono-exponential function) was significantly more rapid after KChIP1 co-transfection (Kv4.3/GFP,  $\tau_{\text{recovery}} = 405.2$  ms,  $n = 13$  vs. Kv4.3/KChIP1-YFP,  $\tau_{\text{recovery}} = 142.4$  ms,  $n = 13$ ;  $P < 0.05$ ). The acceleration in recovery from inactivation was absent when KChIP1 triple EF-hand mutant was co-expressed with Kv4.3 (**Fig. 3B**; Kv4.3/ KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP,  $\tau_{\text{recovery}} = 463.9$  ms,  $n = 10$ ). Second, cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP showed a significant leftward shift in the voltage-dependence of activation of A-type  $K^+$  currents, compared to Kv4.3/GFP control group (Kv4.3/GFP:  $V_{1/2}$ ,  $-20.0 \pm 1.4$  mV,  $n = 13$  vs. Kv4.3/KChIP1-YFP:  $V_{1/2}$ ,  $-32.2 \pm 0.8$  mV,  $n = 13$ ;  $P < 0.05$ ) with no change in mean half-inactivation potential ( $V_{1/2}$ :  $-74.4 \pm 4.1$  mV,  $n = 13$  vs.  $-76.3 \pm 1.2$  mV,  $n = 13$ ) (**Fig. 3C**). Again, no shift in activation/inactivation curves was observed when Kv4.3 was co-expressed with KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP (**Fig. 3C**). Third, co-expression of KChIP1-YFP with Kv4.3 also led to changes in kinetics of Kv4.3 currents. A-type currents of cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP showed significantly faster rise time and slower decay time than those in control Kv4.3/GFP cells (**Fig. 3D,E**). Once more, no changes in kinetics were observed in cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP (**Fig. 3E**). These results indicate that co-transfection of KChIP1-YFP significantly alters the biophysical properties of Kv4.3 channels in HEK293 cells and that  $Ca^{2+}$ -binding domains of KChIP1 are necessary for this modulation.

Since structural evidence points to the importance of Kv4.3 N-terminal region for interactions with KChIP1 (Pioletti et al. 2006), we next assessed the impact of the deletion of 10 amino acids in the proximal N-terminal region of rat Kv4.3 subunit (Kv4.3 $\Delta$ 2-12 construct) on KChIP1-YFP modulatory effects. Co-transfection of KChIP1-YFP with Kv4.3 $\Delta$ 2-12 in HEK293 cells produced no change in  $I_{\text{density}}$  (**Fig. 4A**), recovery from inactivation (**Fig. 4B**), voltage dependence of activation or inactivation (**Fig. 4C**), or in kinetics of the rise and decay (**Fig. 4D**) of Kv4.3 currents, in comparison to cells co-transfected with GFP and Kv4.3 $\Delta$ 2-12. Using confocal microscopy, we found no increase in membrane-to-cytosol ratio of Kv4.3-immunolabelling in cells co-expressing Kv4.3 $\Delta$ 2-12 and KChIP1-YFP, in comparison to cells co-expressing Kv4.3 $\Delta$ 2-12 and GFP (**Fig. 4E-G**). Thus, co-expression of KChIP1-YFP failed to modulate  $K^+$  currents and channels

subcellular distribution in cells expressing mutated Kv4.3 subunits lacking amino acids 2-12 in their proximal N-terminal region, thus indicating that Kv4.3 N-terminus is critical for efficient interactions with KChIP1.

To gain some insight into whether KChIP1 may modulate native Kv4.3 currents in interneurons, we compared the properties of Kv4.3-mediated A-type currents in HEK293 cells ( $\pm$  co-expression of KChIP1) to those of Kv4.3-mediated A-type currents in LM/RAD interneurons (Bourdeau et al. 2007). Co-expression of Kv4.3 with KChIP1-YFP resulted in A-type current properties that did not completely reproduce the characteristics of LM/RAD interneuron A-type  $K^+$  currents (**Supplemental Table 1**), but gave rise to Kv4.3 currents with properties (accelerated recovery from inactivation, activation curve shifted towards subthreshold potentials, faster rise time) approaching the features of endogenous A-type currents in LM/RAD interneurons.

#### **4.5.3 siRNA-MEDIATED SPECIFIC KNOCKDOWN OF KChIP1 EXPRESSION IN SLICE CULTURES**

Having determined the strong modulatory actions of KChIP1 on Kv4.3 channels in expression system, we next examined directly its role in native hippocampus by using short interfering RNA (siRNA) designed to target rat KChIP1 expression (siRNA-KChIP1). To assess the efficacy and specificity of this siRNA, we biolistically co-transfected hippocampal slice cultures (Bourdeau et al. 2007) with plasmid for YFP expression and siRNA-KChIP1. We performed immunoblot analysis and observed a significant reduction in KChIP1 expression in slice cultures co-transfected with YFP and siRNA-KChIP1, relative to slices co-transfected with YFP and siRNA-CTL ( $42.2 \pm 4.8$  % of control,  $n = 3$  experiments,  $P < 0.05$ ; **Fig. 5**). The reduction was specific to KChIP1 since no significant difference was observed in KChIP2 expression in the same experiments ( $78.6 \pm 10.2$  % of control; **Fig. 5**). These results indicate that biolistic siRNA transfection effectively and selectively interferes with KChIP1 expression in slice cultures.

#### **4.5.4 KChIP1 KNOCKDOWN SLOWS A-TYPE $K^+$ CURRENT RECOVERY FROM INACTIVATION SELECTIVELY IN INTERNEURONS**

We next examined if KChIP1 knockdown by siRNA impairs A-type  $K^+$  currents known to be mediated by Kv4.3 in hippocampal LM/RAD interneurons (Bourdeau et al. 2007). A-type  $K^+$  currents were recorded in whole-cell voltage-clamp mode in YFP-expressing interneurons in hippocampal slice cultures after biolistic co-transfection of YFP with either siRNA-CTL or siRNA-KChIP1. Total  $K^+$  currents evoked in TTX (1  $\mu$ M), CdCl<sub>2</sub> (150  $\mu$ M) and TEA (1 mM) by test pulses from a hyperpolarised membrane potential consisted of rapidly inactivating and non-inactivating components (Bourdeau et al. 2007).  $K^+$  currents evoked by similar pulses but from a depolarised membrane potential were composed of delayed rectifier currents. A-type currents were isolated by subtracting the delayed rectifier component from total  $K^+$  currents. The peak current density ( $I_{\text{density}}$ ; +17 mV voltage step) of isolated A-type currents was unaffected in cells transfected with siRNA-KChIP1 relative to control siRNA ( $96.5 \pm 8.4$  % of control,  $n = 6$ ; **Fig. 6A**). The peak  $I_{\text{density}}$  of delayed rectifier  $K^+$  currents (at +17 mV voltage step) was also unchanged in cells transfected with siRNA-KChIP1 relative to control siRNA ( $130.8 \pm 23.6$  % of control,  $n = 6$ ; **Fig. 6B**). These results suggest that, in contrast to findings in expression system, KChIP1 may not critically regulate A-type  $K^+$  current density in hippocampal LM/RAD interneurons.

However, a property of A-type  $K^+$  current was altered as the recovery from inactivation was slower in LM/RAD interneurons transfected with siRNA-KChIP1 compared to siRNA-CTL (**Fig. 6C-E**). Recovery from inactivation was significantly less at inter-pulse interval (IPI) of 5 ms in cells transfected with siRNA-KChIP1 ( $39.8 \pm 16.2$  % of siRNA control;  $n = 6$  siRNA-KChIP1 and 8 siRNA-CTL;  $P < 0.05$ ) and was not different at an IPI of 355 ms (**Fig 6C-D**). The fraction of current recovery ( $I_2/I_1$ ) plotted against IPI (**Fig. 6E**) was best fitted by a biexponential function ( $\tau_{\text{recovery (1)}} = 88.1$  ms, contribution = 28.0 %;  $\tau_{\text{recovery (2)}} = 5.3$  ms, contribution = 72.0 %) in interneurons transfected with siRNA-CTL ( $n = 8$ ) and by a monoexponential function ( $\tau_{\text{recovery}} = 33.1$  ms) in cells transfected with siRNA-KChIP1 ( $n = 6$ ), also indicative of slower recovery from inactivation after KChIP1 knockdown. KChIP1 siRNA transfection did not modify steady-state activation/inactivation properties (**Fig. 6F**) nor the rise and decay kinetics of A-type  $K^+$  currents (**Fig. 6G**).

The effect of KChIP1 siRNA on A-type current recovery from inactivation was cell-type specific because there was no change in the properties of A-type  $K^+$  currents recorded in YFP-expressing CA1 pyramidal cells following siRNA-KChIP1 transfection (**Supplemental Fig. 1**). Overall these results suggests that inhibition of KChIP1 levels in LM/RAD interneurons by siRNA knockdown slows the rate of recovery from inactivation of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents, an effect consistent with the observed increase in recovery from inactivation produced by co-transfection of KChIP1 with Kv4.3 in HEK293 cells. Importantly, this putative modulatory action of KChIP1 on native A-type currents of LM/RAD interneurons appears cell-type specific and absent in CA1 pyramidal cells, consistent with the absence of expression of KChIP1 in CA1 pyramidal cells (Rhodes et al. 2004).

#### **4.5.5 KChIP1 siRNA ACCELERATES REPETITIVE FIRING SELECTIVELY IN INTERNEURONS**

Next we examined the effect of KChIP1 knockdown by siRNA on physiological properties of LM/RAD interneurons which are dependent on A-type  $K^+$  currents. Given that A-type currents regulate repetitive firing properties in many neuronal populations (Connor & Stevens 1971a; Liss et al. 2001; Malin & Nerbonne 2001; Hu et al. 2006), we tested if transfection with siRNA-KChIP1 increased repetitive firing of LM/RAD interneurons during long (1-sec) depolarizing pulses in current-clamp recordings (Williams et al. 1994). The average firing frequency during suprathreshold current injections (200 pA) was significantly higher in LM/RAD interneurons transfected with siRNA-KChIP1 relative to siRNA-CTL ( $169.5 \pm 21.4$  % of control,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ) (**Fig. 7A-B**). Lower frequency repetitive firing evoked by smaller (near threshold) current injections (10-100 pA) was not affected by siRNA-KChIP1 transfection (**Fig. 7B**). The increase in LM/RAD interneuron suprathreshold excitability was also reflected in changes in instantaneous firing frequency. For all action potentials analysed, instantaneous frequencies during the depolarizing pulse were significantly greater in interneurons transfected with siRNA-KChIP1 relative to siRNA-CTL ( $n = 6$ ; **Fig. 7D**).

Because A-type  $K^+$  currents contribute to individual action potential waveform (Shibata et al. 2000) (Yuan et al. 2005) (Kim et al. 2005) (Bourdeau et al. 2007), we analysed also the properties of the first action potentials, as well as the level of spike broadening, during depolarizing current injections (1-sec, 200 pA). We found no differences in the onset time to the first action potential (**Fig. 7C**), or in action potential threshold, amplitude, duration at half-width, afterhyperpolarization (AHP) amplitude and spike broadening (**Supplemental Table 2**) in LM/RAD interneurons transfected with siRNA-KChIP1 relative to siRNA-CTL. These results suggest that KChIP1 downregulation does not affect the waveform of first action potential or spike broadening but influences suprathreshold repetitive firing in LM/RAD interneurons.

Because LM/RAD interneuron display subthreshold membrane potential oscillations (MPOs) which are dependent on Kv4.3 (Bourdeau et al. 2007), we tested if KChIP1 downregulation modified this subthreshold rhythmic activity. In LM/RAD interneurons transfected with siRNA-KChIP1 ( $n = 6$ ), the MPO power ( $126.7 \pm 12.7$  % of control) and peak frequency ( $103.5 \pm 15.8$  % of control), as well as membrane potential tested ( $102.0 \pm 1.9$  % of control) were not different relative to siRNA-CTL ( $n = 6$ ) (**Supplemental Fig. 2**). Altogether, these findings suggest that knockdown of KChIP1 expression in LM/RAD interneurons leads to slower A-type  $K^+$  current recovery from inactivation and enhances suprathreshold excitability, but does not change action potential waveform, spike broadening and subthreshold membrane potential oscillations in these cells.

As for A-type  $K^+$  current recovery from inactivation, the effect of siRNA-KChIP1 on repetitive firing was cell-type specific and absent in CA1 pyramidal cells. During similar long depolarizing current injections, no changes were observed in average firing frequency (**Fig. 7E**), onset time to the first action potential (**Fig. 7F**), instantaneous firing frequencies (**Fig. 7G**) or in MPOs (**Supplemental Fig. 2**) in pyramidal cells transfected siRNA-KChIP1 relative to siRNA-CTL, again consistent with the lack of expression of KChIP1 in CA1 pyramidal cells (Rhodes et al. 2004).

## 4.6 DISCUSSION

The principal findings of our study are that, first in recombinant system, expression of KChIP1 increases membrane localization of Kv4.3 and modulates Kv4.3-mediated current properties, and these Kv4.3/KChIP1 interactions are critically dependent on KChIP1  $\text{Ca}^{2+}$  binding domains and Kv4.3 N-terminal region; and, second in hippocampal slice cultures, downregulation of KChIP1 by RNA interference produced cell-type specific effects that resulted in slower recovery from inactivation of A-type  $\text{K}^+$  currents and higher frequency of repetitive firing in LM/RAD interneurons. These results suggest a role for the  $\text{K}^+$  channel accessory protein KChIP1 in regulation of Kv4.3-mediated A-type current properties and cellular excitability in hippocampal interneurons. Our findings suggest that KChIP1 interacts with Kv4.3 in LM/RAD interneurons, enabling faster recovery from inactivation of A-type currents and thus promoting stronger inhibitory control of firing during sustained activity.

### 4.6.1 RECOMBINANT Kv4.3/KChIP1 INTERACTIONS

Our results indicate that, in HEK293 cells, co-expression of KChIP1 enhanced Kv4.3 membrane trafficking. It also augmented current density, accelerated recovery from inactivation, shifted the activation curve leftward, accelerated rise time and slowed decay of Kv4.3-mediated  $\text{K}^+$  currents. Our findings are consistent with previous reports that heterologous expression of KChIP1 modulates Kv4.3 function (Hatano et al. 2002; Pioletti et al. 2006; Wang et al. 2007). Pioletti *et al.* (2006) showed that the  $\text{Ca}^{2+}$  binding ability of KChIP1 was critical for the enhancement of current density and for the modulation of recovery from inactivation and inactivation phase of Kv4.3 currents. We provide new information on Kv4.3/KChIP1 interactions by showing that this  $\text{Ca}^{2+}$ -binding ability is required in addition for effective KChIP1 modulation of Kv4.3 membrane targeting, as well as for the acceleration of rise time and the shift in steady-state activation of Kv4.3 currents.  $\text{Ca}^{2+}$  seems critical for appropriate KChIP protein conformation and stable Kv4/KChIP assemblies (Zhou et al. 2004; Pioletti et al. 2006). KChIP EF-hands may also act as dynamic sensors of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels near macromolecular Kv4 channel complex (Patel et al. 2002). The importance of EF-hand regions of KChIP1 for



Kv4.3/KChIP1 interactions as a mechanism for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulation of A-type  $\text{K}^+$  currents has not been thoroughly explored in neurons, but could constitute an interesting mechanism for modulation of excitability in hippocampal interneurons which express both Kv4.3 and KChIP1 (Rhodes et al. 2004; Bourdeau et al. 2007; Menegola et al. 2008).

Our deletion experiments showed that amino acids 2-12 of Kv4.3 are required for efficient modulation by KChIP1 of Kv4.3 subcellular distribution and current properties in recombinant system. Recently, structural analysis revealed two sites, in Kv4.3 N-terminal region, that may contribute to Kv4.3/KChIP1 interactions (Pioletti et al. 2006; Wang et al. 2007). One site may involve residues Trp8, Phe11 and Trp19 (Pioletti et al. 2006; Wang et al. 2007). Since Kv4.3 $\Delta$ 2-12 is lacking two of these important residues (Trp8, Phe11), our findings of absence of modulation by KChIP1 are consistent with the structural evidence. Although not examined yet in neurons, it will be interesting to determine if these residues in Kv4.3 N-terminal region are essential for the Kv4.3/KChIP1 interactions we observed in LM/RAD interneurons.

#### **4.6.2 KChIP1 MODULATION OF INTERNEURON A-TYPE $\text{K}^+$ CURRENTS**

Our findings in LM/RAD interneurons identify a role for KChIP1 in cell-type specific modulation of native A-type  $\text{K}^+$  currents. We previously showed that Kv4.3 mediates A-type currents in these neurons (Bourdeau et al. 2007) and given the recombinant Kv4.3/KChIP1 interactions described here and elsewhere (An et al. 2000; Hatano et al. 2002; Pioletti et al. 2006; Wang et al. 2007), the impairment in recovery from inactivation of A-type  $\text{K}^+$  currents observed in interneurons transfected with KChIP1 siRNA is likely due to a disturbance of endogenous Kv4.3/KChIP1 interactions. Furthermore, these actions are not unspecific effects since we found that KChIP1 downregulation by siRNA does not alter properties of A-type  $\text{K}^+$  currents in CA1 pyramidal cells, which is consistent with evidence that, in these cells, Kv4.2 mediates A-type  $\text{K}^+$  currents and KChIP2, 3 and 4 are the accessory subunits present (Serodio & Rudy 1998; Rhodes et al. 2004; Kim et al. 2005; Bourdeau et al. 2007).

In recombinant system, we observed that co-expression of KChIP1 modulated many Kv4.3 current properties (current density, rise time, decay, activation curve and recovery

from inactivation) and resulted in recombinant A-type  $K^+$  currents with features more similar to endogenous A-type  $K^+$  currents in LM/RAD interneurons. In contrast, we found that KChIP1 downregulation by siRNA in interneurons altered recovery from inactivation but did not influence other A-type  $K^+$  current properties affected in recombinant system. The disparity in findings between HEK293 cells and interneurons could be due to several reasons. First, they employed different approaches, overexpression in recombinant system and siRNA knockdown in native neurons, which are not directly comparable. Second, the siRNA-mediated knockdown of KChIP1 in slice cultures led to approximately 60% inhibition of protein levels. Thus, residual endogenous KChIP1 might have been sufficient to modulate other aspects of Kv4.3 currents in interneurons but not recovery from inactivation. Third, and perhaps more importantly, recent work in recombinant system and CA1 pyramidal cells suggest that different Kv4  $\beta$ -subunits of the dipeptidyl-peptidase-like protein (DPPL) and KChIP families could exhibit redundant regulatory effects on native A-type channels (Kim et al. 2008). Thus, additional Kv4 accessory proteins may also have KChIP-like modulatory function in interneurons and compensate the effects of KChIP1 downregulation on Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents. Since no members of the KChIP family other than KChIP1 are expressed in CA1 hippocampal interneurons (Rhodes et al. 2004), a potential contributor could be the DPPL protein DPP10, which is expressed in interneurons and has many KChIP1-like effects on recombinant Kv4 currents (Jerng et al. 2004b; Zagha et al. 2005). Consistent with this suggestion, A-type  $K^+$  currents in cells with multiple functionally redundant Kv4  $\beta$ -subunits appear more resistant to particular auxiliary protein downregulation than cells that do not. For example, in cardiomyocytes expressing Kv4.2/Kv4.3 along with the accessory subunit KChIP2 but not DPP10, DPPX (another DPPL protein) nor other KChIPs (An et al. 2000; Qi et al. 2003; Patel & Campbell 2005; Nadal et al. 2006), KChIP2 knockout leads to a total loss of transient outward  $K^+$  currents ( $I_{to}$ , heart equivalent of A-type  $K^+$  currents) (Kuo et al. 2001). Alternatively, in dentate gyrus granule cells, that express Kv4.2/Kv4.3 along with KChIP2, 3 and 4, as well as DPPX (Serodio & Rudy 1998; Rhodes et al. 2004; Nadal et al. 2006), the suppression of KChIP3 causes only a modest inhibition of A-type currents (Lilliehook et al. 2003). Finally, proteins other than KChIPs and DPPLs can modulate Kv4 currents in heterologous cells (e.g. NCS-1, filamin, Kv $\beta$ s, etc.) (Birnbaum et al. 2004;

Jerng et al. 2004a), and such proteins could also be involved in A-type  $K^+$  current regulation in LM/RAD interneurons. However, no clear evidence of association of such proteins with native neuronal Kv4 channels has been shown yet (Maffie & Rudy 2008).

#### 4.6.3 KCHIP1 MODULATION OF INTERNEURON EXCITABILITY

Modulation of endogenous A-type  $K^+$  (or  $I_{to}$ ) currents by KCHIP subunits has been associated with regulation of firing in cardiomyocytes (Kuo et al. 2001) and in dopaminergic *substantia nigra* neurons (Liss et al. 2001). Our finding that suprathreshold excitability of LM/RAD interneurons is enhanced by KCHIP1 downregulation is consistent with such a regulatory role. Our results that KCHIP1 downregulation resulted in a selective change in recovery from inactivation without action on current density or other properties of A-type  $K^+$  currents are in agreement with the selective effects on suprathreshold repetitive firing frequency without change in action potential waveform, first action potential onset time or spike broadening during repetitive firing. Because A-type current density was unchanged in interneurons after KCHIP1 siRNA transfection, the number of A-type  $K^+$  channels available for activation at the start of strong depolarizing current injections appear unchanged. In addition the intact steady-state activation and inactivation properties as well as kinetics of A-type  $K^+$  currents are consistent with no changes in onset time of the first action potentials and the waveform of individual action potentials during repetitive firing after KCHIP1 downregulation. Thus, after an initial similar activation of A-type  $K^+$  channels by sustained depolarization, the impairment in recovery from inactivation may leave interneurons with a more significant portion of channels inactivated and thus result in a reduction of inhibitory control of repetitive firing.

We previously showed that subthreshold membrane potential oscillations (MPOs) in interneurons are impaired after Kv4.3 downregulation which result in reduced peak density of A-type  $K^+$  currents (Bourdeau et al. 2007). In the present experiments, downregulation of KCHIP1 by siRNA did not change MPOs. Thus, since no substantial membrane depolarization is taking place during subthreshold MPOs (~2-5 mV), only a fraction of A-type channels may be activated, leaving a substantial pool of channels ready for activation during sustained MPOs. Therefore, slower recovery from inactivation of A-

type  $K^+$  channels is less critical for this subthreshold rhythmic activity than for suprathreshold repetitive firing in interneurons.

In conclusion, our results suggest that KChIP1 interacts with Kv4.3 in LM/RAD interneurons, enabling faster recovery from inactivation of A-type currents and thus promoting stronger inhibitory control of firing during sustained activity. These findings uncover a role for KChIP1 in the modulation of Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents and cellular excitability in hippocampal interneurons. Given the recent evidence that KChIP3 is implicated in modulation of synaptic plasticity in dentate gyrus granule cells (Lilliehook et al. 2003), that Kv4 channels aggregate in clusters at neuronal plasma membrane (Kollo et al. 2006) and that their membrane localization can be modulated by activity (Kim et al. 2007), future studies will help determine how KChIP subunits may contribute to these phenomena in hippocampal interneurons.

#### 4.7 REFERENCES

- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ.** Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403: 553-556, 2000.
- Bähring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O, Isbrandt D.** Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* 276: 23888-23894, 2001.
- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader LA.** Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* 84: 803-833, 2004.
- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC.** Kv4.3-mediated A-type  $K^+$  currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 27: 1942-1953, 2007.
- Burgoyne RD.** Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal  $Ca^{2+}$  signalling. *Nat Rev Neurosci* 8: 182-193, 2007.
- Chapman CA, Lacaille JC.** Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of stratum lacunosum-moleculare. *J Neurophysiol* 81: 1296-1307, 1999b.

**Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 233-285, 1999.

**Connor JA, Stevens CF.** Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213: 31-53, 1971a.

**Gu N, Hu H, Vervaeke K, Storm JF.** SK (KCa2) channels do not control somatic excitability in CA1 pyramidal neurons but can be activated by dendritic excitatory synapses and regulate their impact. *J Neurophysiol* 100: 2589-2604, 2008.

**Hasdemir B, Fitzgerald DJ, Prior IA, Tepikin AV, Burgoyne RD.** Traffic of Kv4 K<sup>+</sup> channels mediated by KCHIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway. *J Cell Biol* 171: 459-469, 2005.

**Hatano N, Ohya S, Imaizumi Y.** Functional interaction between KCHIP1 and GFP-fused Kv4.3L co-expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 444: 80-88, 2002.

**Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D.** K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387: 869-875, 1997.

**Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RWt.** The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50: 89-100, 2006.

**Jerng HH, Pfaffinger PJ, Covarrubias M.** Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 27: 343-369, 2004a.

**Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ.** Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 87: 2380-2396, 2004b.

**Kim J, Jung SC, Clemens AM, Petralia RS, Hoffman DA.** Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K<sup>+</sup> channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* 54: 933-947, 2007.

**Kim J, Nadal MS, Clemens AM, Baron M, Jung SC, Misumi Y, Rudy B, Hoffman DA.** Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 100: 1835-1847, 2008.

**Kim J, Wei DS, Hoffman DA.** Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* 569: 41-57, 2005.

**Kollo M, Holderith NB, Nusser Z.** Novel subcellular distribution pattern of A-type K<sup>+</sup> channels on neuronal surface. *J Neurosci* 26: 2684-2691, 2006.

**Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR.** A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KChIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107: 801-813, 2001.

**Lien CC, Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Jonas P.** Gating, modulation and subunit composition of voltage-gated K(+) channels in dendritic inhibitory interneurons of rat hippocampus. *J Physiol* 538: 405-419, 2002.

**Lilliehook C, Bozdagi O, Yao J, Gomez-Ramirez M, Zaidi NF, Wasco W, Gandy S, Santucci AC, Haroutunian V, Huntley GW, Buxbaum JD.** Altered Abeta formation and long-term potentiation in a calenilin knock-out. *J Neurosci* 23: 9097-9106, 2003.

**Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoﬀ H, Roeper J.** Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* 20: 5715-5724, 2001.

**Maffie J, Rudy B.** Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K<sup>+</sup> currents in neurons. *J Physiol* 586: 5609-5623, 2008.

**Malin SA, Nerbonne JM.** Molecular heterogeneity of the voltage-gated fast transient outward K<sup>+</sup> current, I(Af), in mammalian neurons. *J Neurosci* 21: 8004-8014, 2001.

**Menegola M, Misonou H, Vacher H, Trimmer JS.** Dendritic A-type potassium channel subunit expression in CA1 hippocampal interneurons. *Neuroscience* 154: 953-964, 2008.

**Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res* 1094: 1-12, 2006.

**O'Callaghan DW, Hasdemir B, Leighton M, Burgoyne RD.** Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K<sup>+</sup> channels. *J Cell Sci* 116: 4833-4845, 2003.

**Patel SP, Campbell DL.** Transient outward potassium current, 'Ito', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569: 7-39, 2005.

**Patel SP, Campbell DL, Strauss HC.** Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 545: 5-11, 2002.

**Pioletti M, Findeisen F, Hura GL, Minor DL, Jr.** Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat Struct Mol Biol* 13: 987-995, 2006.

**Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL, Akinsanya KO.** Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 373: 179-189, 2003.

**Rhodes KJ, Carroll KI, Sung MA, Doliveira LC, Monaghan MM, Burke SL, Strassle BW, Buchwalder L, Menegola M, Cao J, An WF, Trimmer JS.** KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci* 24: 7903-7915, 2004.

**Scannevin RH, Wang K, Jow F, Megules J, Kopsco DC, Edris W, Carroll KC, Lu Q, Xu W, Xu Z, Katz AH, Olland S, Lin L, Taylor M, Stahl M, Malakian K, Somers W, Mosyak L, Bowlby MR, Chanda P, Rhodes KJ.** Two N-terminal domains of Kv4 K(+) channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* 41: 587-598, 2004.

**Serodio P, Rudy B.** Differential expression of Kv4 K<sup>+</sup> channel subunits mediating subthreshold transient K<sup>+</sup> (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* 79: 1081-1091, 1998.

**Serodio P, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 75: 2174-2179, 1996.

**Shibata R, Nakahira K, Shibasaki K, Wakazono Y, Imoto K, Ikenaka K.** A-type K<sup>+</sup> current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20: 4145-4155, 2000.

**Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J.** Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 10: 32-39, 2007.

**Williams S, Samulack DD, Beaulieu C, LaCaille JC.** Membrane properties and synaptic responses of interneurons located near the stratum lacunosum-moleculare/radiatum border of area CA1 in whole-cell recordings from rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 71: 2217-2235, 1994.

**Yuan W, Burkhalter A, Nerbonne JM.** Functional role of the fast transient outward K<sup>+</sup> current IA in pyramidal neurons in (rat) primary visual cortex. *J Neurosci* 25: 9185-9194, 2005.

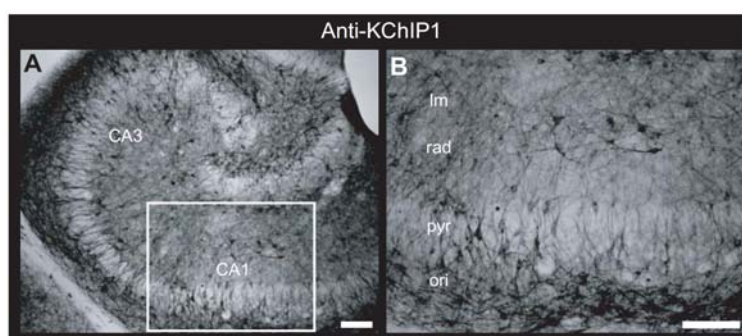
**Zagha E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, McCormack T, Akinsanya KO, Qi SY, Rudy B.** DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 280: 18853-18861, 2005.

**Zhou W, Qian Y, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ, Choe S.** Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K(+) channels. *Neuron* 41: 573-586, 2004.

#### 4.8 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Julie Pepin and Catherine Bourgeois for technical assistance as well as France Morin for critical reading of the manuscript. Plasmid constructs were kindly provided by R.D. Burgoyne. This research was supported by grants to J.-C.L. from the Canadian Institutes of Health Research (MT-10848), Fonds de la recherche en santé du Québec (Groupe de recherche sur le système nerveux central) and the Canada Research Chair Program (J.-C.L.; Canada Research Chair in Cellular and Molecular Neurophysiology).

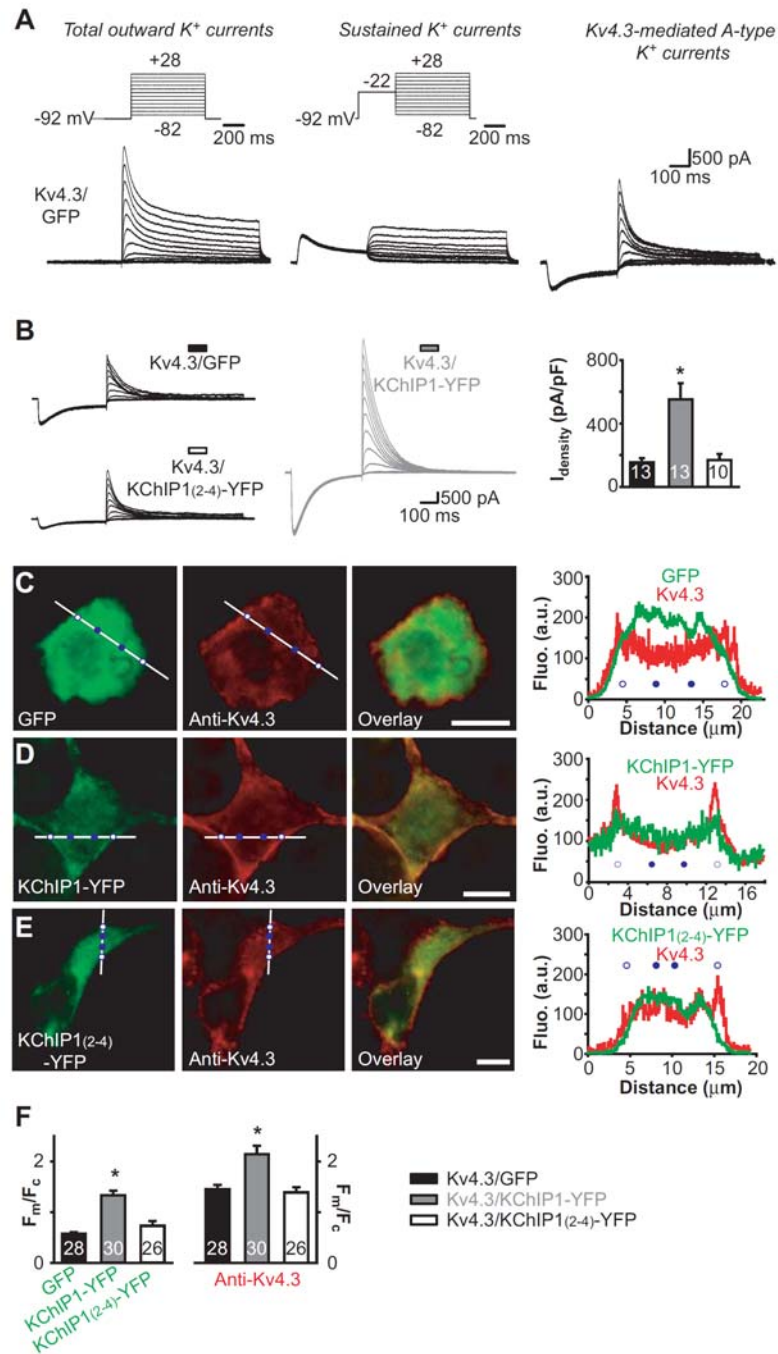
#### 4.9 TABLES, FIGURES AND LEGENDS



**FIGURE 1. Expression of KChIP1 in LM/RAD interneurons in hippocampal slice cultures**

*A*, Digital image of a hippocampal slice culture immunolabeled with KChIP1 antibody. *B*, Higher magnification image of the region delimited by the white rectangle in (*A*), showing individual KChIP1-positive multipolar interneurons at the junction of *strata lacunosum-moleculare and radiatum*, as well as in different layers of CA1 hippocampus. Abbreviations: *stratum oriens* (ori), *stratum pyramidale* (pyr), *stratum radiatum* (rad) and *stratum lacunosum-moleculare* (lm). Scale bars: 100µm.

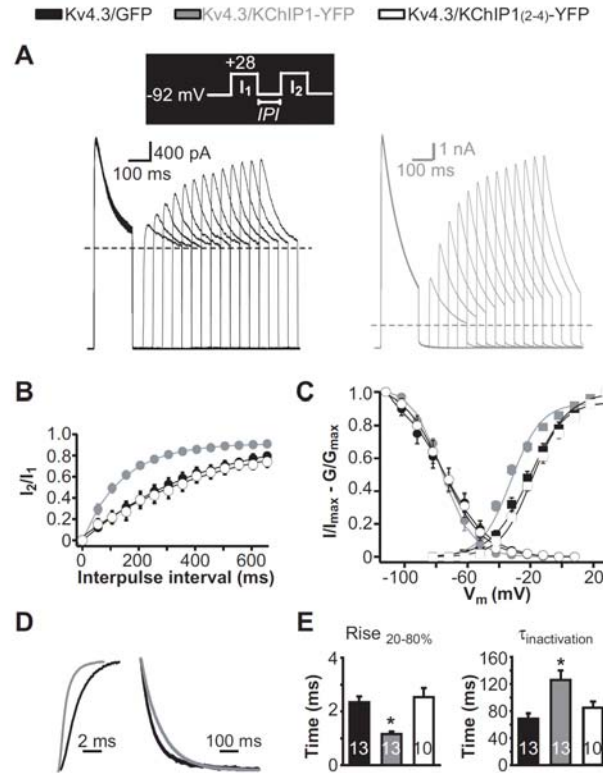




**FIGURE 2. Modulation of Kv4.3  $I_{\text{density}}$  and membrane localization by KChIP1 in HEK293 cells**

*A*, Whole-cell  $K^+$  currents from a representative HEK293 cell co-transfected with Kv4.3 and GFP plasmids (control). Total  $K^+$  currents (left) and sustained  $K^+$  currents (middle) were evoked using voltage step protocols enabling isolation of Kv4.3-mediated transient A-type  $K^+$  currents by subtraction (right). *B*, Traces from representative cells, showing

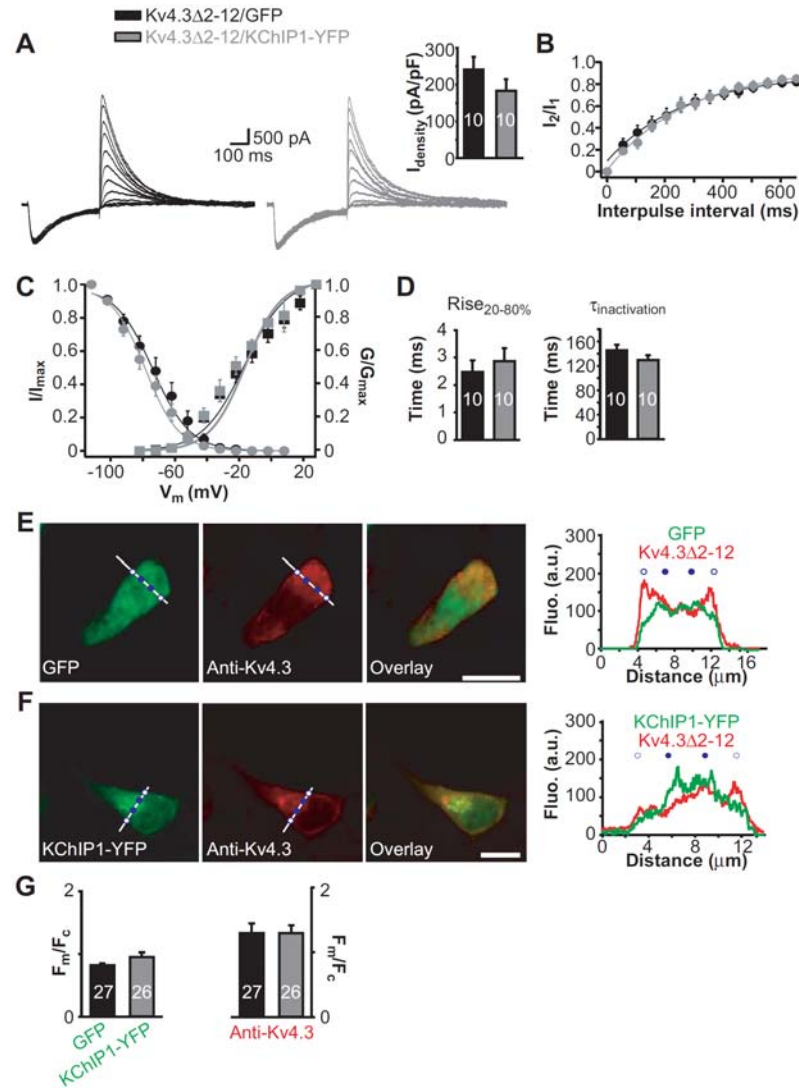
enhanced Kv4.3-mediated A-type currents when KChIP1-YFP was co-transfected (grey traces; middle), compared to co-transfection with GFP or the EF-hand triple mutant KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP (black traces; left). Summary bar graph for all cells (right) showing increased Kv4.3-mediated A-type current density ( $I_{\text{density}}$ ; for steps to +28 mV) with KChIP1-YFP co-transfection. *C*, Confocal images of a representative HEK293 cell co-transfected with Kv4.3 and GFP. Fluorescence intensity values were taken along a line positioned across the cell body (avoiding the nucleus) for GFP (left) and Kv4.3 immunolabelling (middle) at points corresponding to membrane ( $F_m$ ; open circle) and cytoplasmic ( $F_c$ ; filled circle) regions. Graph of fluorescence measures (right; fluo., fluorescence; a.u., arbitrary units). GFP distribution is diffuse whereas Kv4.3 localization is moderate at membranes and diffuse in cytosol. *D*, Images and graph obtained from a representative cell co-expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP cell, showing membrane co-localization of KChIP1-YFP and Kv4.3. *E*, Images and graph from a representative cell co-expressing Kv4.3 and KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP, exhibiting modest membrane and diffuse cytosolic localization of KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP and Kv4.3. *F*, Summary histograms of membrane-to-cytosol fluorescence ratio ( $F_m/F_c$ ) for GFP, KChIP1-YFP and KChIP1<sub>(2-4)</sub>-YFP (left) and Kv4.3 (right), showing increase membrane targeting of KChIP1 and Kv4.3 when co-expressed together. \* Different ( $P < 0.05$ ) from Kv4.3/GFP (control). Scale bars in *C-E*: 10  $\mu\text{m}$ .



**FIGURE 3. KChIP1 modulation of Kv4.3 current properties in HEK293 cells**

*A*, Recovery from inactivation of recombinant Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents was measured using a paired-pulse protocol (inset) at varying inter-pulse interval (IPI; 55-655 ms). Representative K<sup>+</sup> current waveforms illustrate that Kv4.3 currents recover faster from inactivation in cells co-expressing KChIP1-YFP (right) compared to Kv4.3/GFP control cells (left). Dotted lines indicate baseline (sustained current level) for measurements of A-type component (peak transient current). *B*, Plot of normalized recovery from inactivation data against IPI, demonstrating faster recovery kinetics in cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP ( $n = 13$ ) than in control cells (Kv4.3/GFP;  $n = 13$ ) or in cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1(2-4)-YFP ( $n = 10$ ). *C*, Graph of A-type K<sup>+</sup> current activation curves (conductance-voltage relation  $G/G_{\max}$ ; squares) and steady-state inactivation curves ( $I/I_{\max}$ ; circles) fitted with Boltzmann functions, showing leftward shift of the activation curve in cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP ( $n = 13$ ) compared to cells co-expressing Kv4.3 and GFP cells ( $n = 13$ ) or Kv4.3 and KChIP1(2-4)-YFP ( $n = 10$ ). *D*, Representative records of Kv4.3-mediated A-type currents (during +28 mV voltage

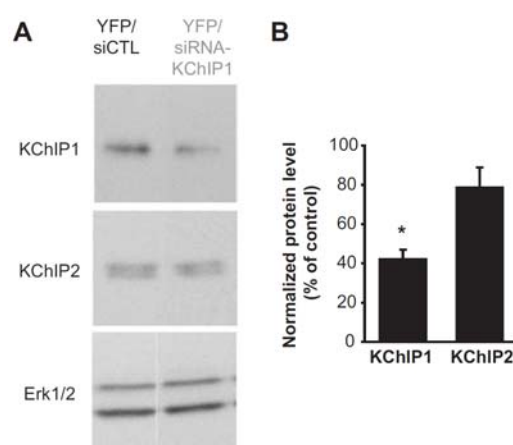
step) showing faster rise and slower decay in cells co-expressing Kv4.3 and KChIP1-YFP than in control cells co-expressing Kv4.3 and GFP (current amplitude was normalized for clarity). *E*, Summary bar graphs for all cells of 20-80 % rise time (left) and inactivation time constant ( $\tau_{\text{inactivation}}$  from monoexponential function; right) for all groups. \* Different ( $P < 0.05$ ) from Kv4.3/GFP (control).



**FIGURE 4. N-terminal region of Kv4.3 is critical for functional interaction with KChIP1 in HEK293 cells**

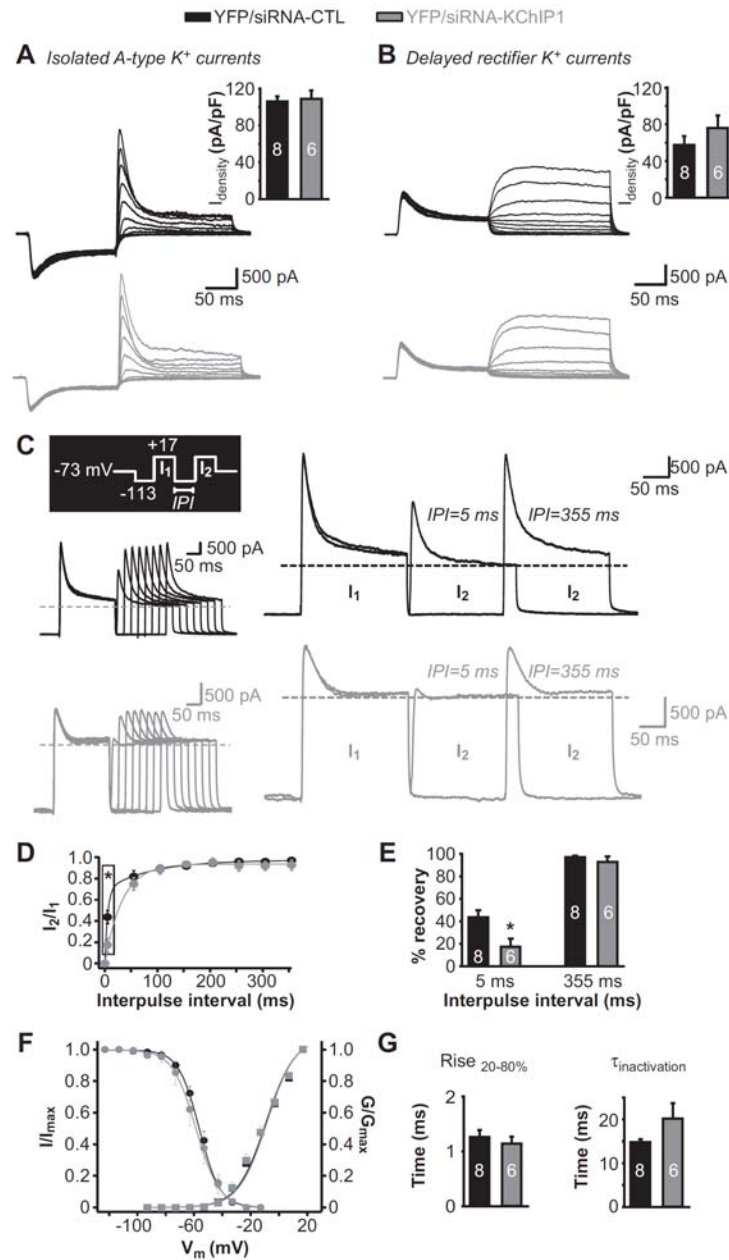
*A*, Representative traces and summary bar graph showing that A-type  $K^+$  currents recorded in HEK293 cells co-transfected with KChIP1-YFP and truncated Kv4.3 $\Delta$ 2-12 had similar  $I_{\text{density}}$  as cells co-transfected with GFP and Kv4.3 $\Delta$ 2-12, thus indicating a loss of modulatory actions of KChIP1 on Kv4.3 subunits with mutated proximal N-terminal region. *B-D*, A-type  $K^+$  currents exhibited similar recovery from inactivation (*B*), steady-state activation ( $G/G_{\text{max}}$ ) and inactivation ( $I/I_{\text{max}}$ ) curves (*C*), as well as rise and decay kinetics (*D*), in cells co-expressing Kv4.3 $\Delta$ 2-12 and KChIP1-YFP (n = 10) and in cells co-

expressing Kv4.3 $\Delta$ 2-12 and GFP ( $n = 10$ ). *E-F*, Confocal images and graphs of fluorescence measures illustrating the similar Kv4.3 fluorescence immunolabeling in representative HEK293 cells co-expressing Kv4.3 $\Delta$ 2-12 with either GFP (*E*) or KChIP1-YFP (*F*). *G*, Summary histograms of membrane-to-cytosol ratio ( $F_m/F_c$ ) for GFP and KChIP1-YFP (left) and Kv4.3 immunolabeling (right), showing the absence of modulation of Kv4.3 localization by KChIP1-YFP in cells expressing Kv4.3 with truncated N-terminal region ( $\Delta$ 2-12). Scale bars in *E,F*: 10  $\mu$ m.



**FIGURE 5. Efficient and selective knockdown of KChIP1 expression in slice cultures by siRNA**

*A*, Western blot of hippocampal slice cultures biolistically co-transfected with YFP and either siRNA-CTL (left) or siRNA-KChIP1 (right). Protein level was probed with specific antibodies against KChIP1 (upper) and KChIP2 (middle), and was normalized to Erk1/2 expression (bottom). *B*, Summary bar graph showing a reduction in KChIP1, but not KChIP2, protein levels in slice cultures transfected with siRNA-KChIP1 relative to siRNA-CTL ( $n = 3$ ). Data are presented in percentage of the control YFP/siRNA-CTL group. \*  $P < 0.05$ .

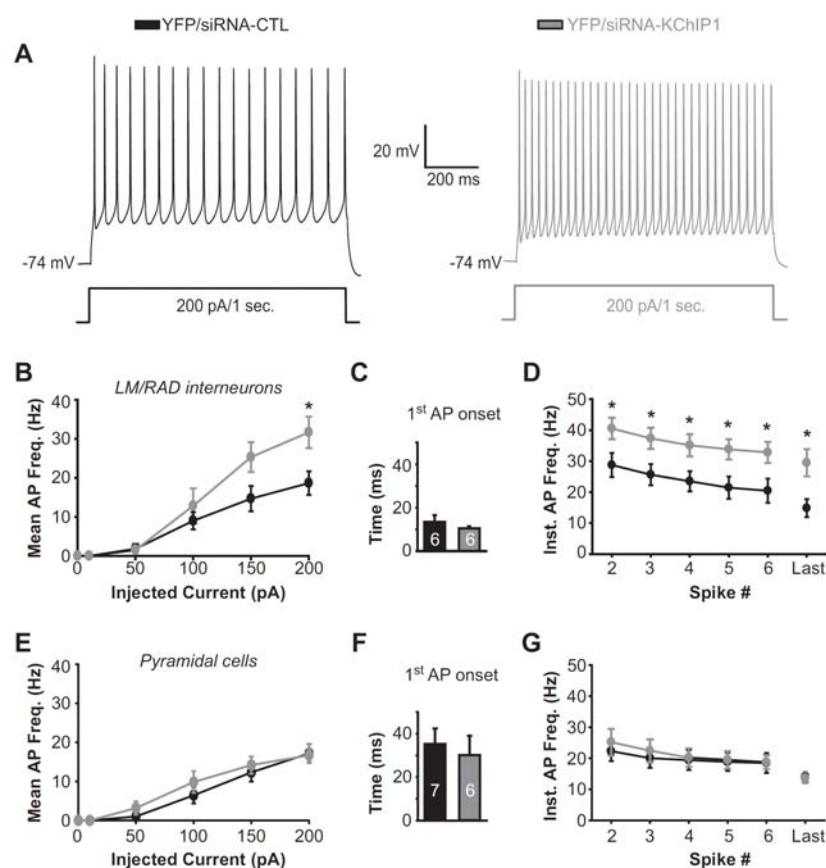


**FIGURE 6. siRNA-KChIP1 slows A-type  $K^+$  current recovery from inactivation in LM/RAD interneurons**

*A*, Whole-cell  $K^+$  currents from LM/RAD interneurons in TTX (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CdCl}_2$  (150  $\mu\text{M}$ ) and TEA (1 mM). Representative traces of isolated A-type  $K^+$  currents and summary bar graph of peak  $I_{\text{density}}$  (right inset; +17 mV voltage step) illustrating that transfection with siRNA-KChIP1 (grey) does not affect  $I_{\text{density}}$  in comparison to siRNA-CTL (black). *B*, Traces of delayed rectifier  $K^+$  currents from the same cells and summary graph of peak



$I_{\text{density}}$  (at +17 mV) showing that  $I_{\text{density}}$  was also unchanged after siRNA-KChIP1 transfection. *C*, Recovery from inactivation (left) was determined using a paired-pulse protocol at varying inter-pulse interval (IPI; black box). Representative traces (right) showing recovery from inactivation at early (5 ms) and late (355 ms) IPIs, and the reduction in recovery from inactivation at the early IPI in cells transfected with siRNA-KChIP1 (grey) compared to cells transfected with siRNA-CTL (black). Dotted lines indicate baseline (sustained current level) for measurements of A-type component (peak transient current). *D*, Plot of recovery from inactivation ( $I_2/I_1$ ) against IPI and exponential function best fit for all cells transfected with siRNA-CTL ( $n = 8$ ; biexponential function) and siRNA-KChIP1 ( $n = 6$ ; monoexponential function). *E*, Summary bar graph of proportion of A-type  $K^+$  current recovery from inactivation at IPIs of 5 and 355 ms for all cells, showing impairment in initial recovery in cells after siRNA-KChIP1 transfection. *F*, Graph of steady-state activation or inactivation curves showing no changes after transfection of siRNA-KChIP1 ( $n = 6$ ) relative to siRNA-CTL ( $n = 8$ ). *G*, Bar graphs illustrating similar 20-80 % rise time (left) and inactivation time constant (right;  $\tau_{\text{inactivation}}$  from monoexponential function) for all cells transfected with siRNA-CTL and siRNA-KChIP1 (+17 mV voltage step). \* Different ( $P < 0.05$ ) from YFP/siRNA-CTL.



**FIGURE 7. siRNA-KChIP1 accelerates repetitive firing in interneurons**

*A*, Whole-cell current-clamp traces in DNQX (25  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M) and Gabazine (5  $\mu$ M) showing suprathreshold repetitive firing of action potentials during 1-sec depolarizing current pulses (200 pA) from LM/RAD interneurons transfected with siRNA-CTL (black) or siRNA-KChIP1 (grey). *B*, Summary graph of mean action potential (AP) frequency during series of 1-sec depolarizing current steps, illustrating the increase in firing frequency at suprathreshold stimulation intensity (200 pA) in all interneurons transfected with siRNA-KChIP1 ( $n = 6$ ) relative to siRNA-CTL ( $n = 6$ ). *C*, Bar graph of onset time to the 1<sup>st</sup> action potential (200 pA, 1-sec current pulses), indicating no differences with siRNA-KChIP1 transfection. *D*, Summary plot demonstrating the increase in instantaneous firing frequency for all analysed action potentials (2<sup>nd</sup> to 6<sup>th</sup> and last) in trains induced by current pulses (200 pA, 1-sec) in interneurons transfected with siRNA-KChIP1 ( $n = 6$ ) relative to siRNA-CTL ( $n = 6$ ). *E-G*, In CA1 pyramidal cells

transfected with siRNA-KChIP1 (grey;  $n = 6$ ), no differences were found in mean firing frequency ( $E$ ), time of onset of 1<sup>st</sup> action potential ( $F$ ; 200 pA, 1-sec steps) and instantaneous firing frequency ( $G$ ; 200 pA, 1-sec steps) compared to siRNA-CTL ( $n = 7$ ).

\* Different ( $P < 0.05$ ) from YFP/siRNA-CTL.

**Supplemental Table 1. A-type  $K^+$  current properties in untransfected LM/RAD interneurons in slice cultures**

Capacitance (pF)	$29.1 \pm 2.2$
Resting membrane potential (mV)	$-75.3 \pm 3.3$
<u>A-type <math>K^+</math> currents</u> <sup>a</sup>	
$I_{\text{density}}$ (pA/pF)	$98.2 \pm 7.8$
Activation	
$V_{1/2}$ (mV) <sup>b</sup>	$-9.5 \pm 0.8$
$k$ (mV)	$11.3 \pm 0.4$
Inactivation	
$V_{1/2}$ (mV) <sup>b</sup>	$-52.5 \pm 1.0$
$k$ (mV)	$-7.2 \pm 0.4$
Rise time <sub>20-80%</sub> (ms) <sup>c</sup>	$1.57 \pm 0.15$
$\tau_{\text{inactivation}}$ (ms) <sup>c</sup>	$14.7 \pm 1.2$
$\tau_{\text{recovery}}$ <sup>d</sup>	
$\tau_1$ (ms); contribution	$6.5 \pm 3.5$ ; 71%
$\tau_2$ (ms); contribution	$99.8 \pm 47.2$ ; 29%

**a** Whole-cell voltage-clamp recordings made in TTX/CdCl<sub>2</sub>/ low TEA; n = 6.

**b** It should be noted that external Cd<sup>2+</sup> typically shifts activation and inactivation curves to the right (Song *et al.* 1998; Zhang and McBain 1995).

**c** Currents obtained with test pulses to +17 mV.

**d** V<sub>h</sub> = -73 mV; pre-pulse to -123 mV; test pulse to +17 mV.

## References

**Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ.**

Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18, 3124-3137, 1998.

**Zhang L, McBain CJ.** Voltage-gated potassium currents in stratum oriens-alveus

inhibitory neurones of the rat CA1 hippocampus. *J Physiol* 488 ( Pt 3), 647-660, 1995.

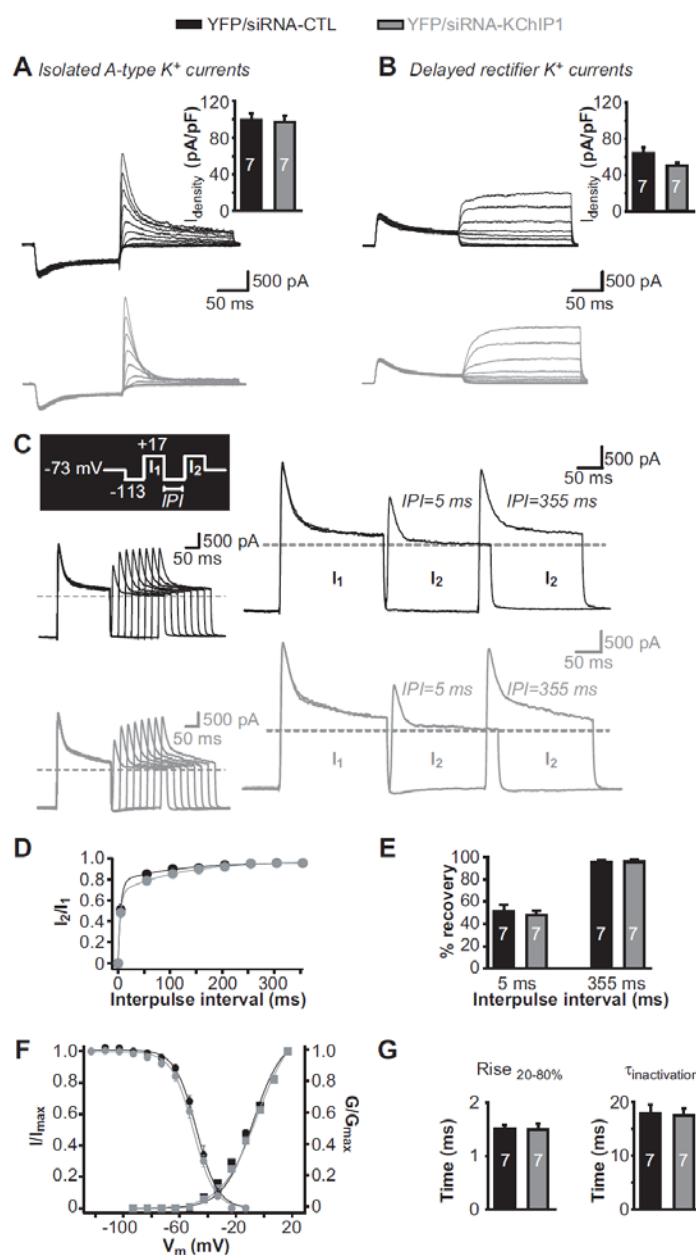
**Supplemental Table 2. Similar action potential waveform and broadening in transfected interneurons in slice cultures**

	YFP/siRNA-CTL (n = 6)	YFP/siRNA-KChIP1 (n = 6)
<u>Action potential waveform<sup>a, b</sup></u>		
Threshold (mV)	$-53.9 \pm 1.9$	$-53.0 \pm 1.3$
Amplitude (mV)	$99.0 \pm 3.7$	$93.0 \pm 3.8$
Half-width duration (ms)	$2.30 \pm 0.22$	$1.91 \pm 0.14$
AHP amplitude (mV)	$10.6 \pm 2.8$	$13.9 \pm 0.7$
<u>Action potential broadening<sup>a, c</sup></u>		
AP #2 (Relative half-width)	$1.19 \pm 0.04$	$1.39 \pm 0.11$
AP #3 (Relative half-width)	$1.28 \pm 0.06$	$1.60 \pm 0.20$
AP #4 (Relative half-width)	$1.35 \pm 0.08$	$1.74 \pm 0.25$
AP #2 (Relative half-width)	$1.37 \pm 0.08$	$1.84 \pm 0.30$

**a** Holding potential: -60 mV; cells submitted to 1-sec, +200 pA current injections.

**b** Properties of the first action potentials induced.

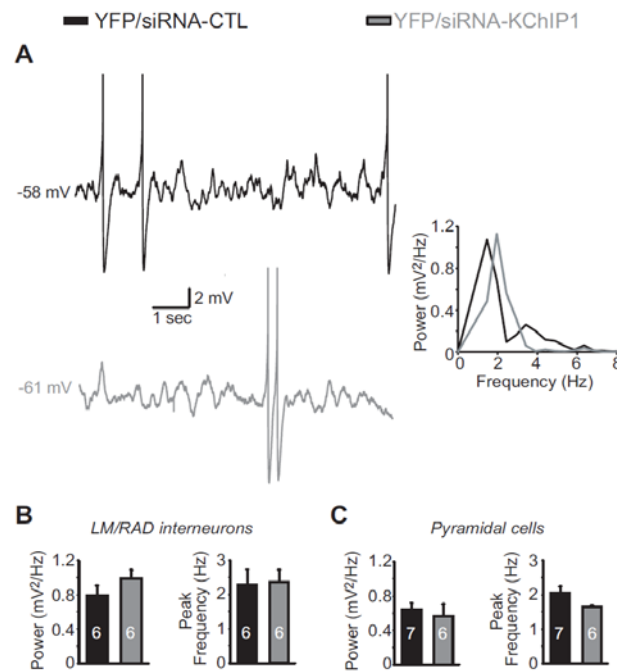
**c** Half-width values normalized to AP #1.



**FIGURE S1. siRNA-KChIP1 does not affect A-type  $K^+$  currents in CA1 pyramidal cells in slice cultures**

*A*, Representative traces of whole-cell isolated A-type  $K^+$  currents and summary bar graph of peak current density ( $I_{\text{density}}$ ) (inset; at +17 mV voltage step) illustrating no changes in CA1 pyramidal cells after transfection of siRNA-KChIP1 (grey) in comparison to siRNA-CTL (black). *B*, Traces of delayed rectifier  $K^+$  currents from the same cells and summary graph of peak  $I_{\text{density}}$  (at +17 mV) showing that  $I_{\text{density}}$  was also unchanged after siRNA-KChIP1 transfection. *C*, Paired-pulse protocol for measurement of recovery from

inactivation (left) and traces better showing recovery from inactivation at early (5 ms) and late (355 ms) IPIs (right). Recovery from inactivation of A-type current was similar in pyramidal cells transfected with siRNA-CTL and siRNA-KChIP1. *D*, Plot of recovery from inactivation ( $I_2/I_1$ ) against IPI and biexponential function best fit for all pyramidal cells showing similar time course of recovery from inactivation after transfection of siRNA-CTL ( $\tau_{\text{recovery (1)}} = 117.3$  ms, contribution = 18.4 %;  $\tau_{\text{recovery (2)}} = 4.9$  ms, contribution = 81.6 %;  $n = 7$ ) and siRNA-KChIP1 ( $\tau_{\text{recovery (1)}} = 116.7$  ms, contribution = 30.3 %;  $\tau_{\text{recovery (2)}} = 4.2$  ms, contribution = 69.7 %;  $n = 7$ ). *E*, Summary bar graph showing no change in proportion of A-type  $K^+$  current recovered from inactivation at IPIs of 5 and 355 ms after siRNA-KChIP1 transfection. *F*, Graph demonstrating no change in steady-state activation or inactivation curves after transfection with siRNA-KChIP1 ( $n = 7$ ) compared to siRNA-CTL ( $n = 7$ ). *G*, Bar graphs illustrating similar 20-80 % rise time (left) and inactivation time constants (right;  $\tau_{\text{inactivation}}$  from monoexponential functions) for all pyramidal cells transfected with siRNA-CTL and siRNA-KChIP1 (+17 mV voltage step).



**FIGURE S2. siRNA-KChIP1 does not affect subthreshold membrane potential oscillations in CA1 interneurons**

*A*, Representative current-clamp traces (left) in DNQX (25  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M) and Gabazine (5  $\mu$ M), and corresponding power spectra (right), illustrating that MPOs were similar in interneurons transfected with siRNA-KChIP1 (grey) and siRNA-CTL (black). *B-C*, Summary bar graphs for all cells showing that power (left) and peak frequency (right) of MPOs were similar in both siRNA-CTL and siRNA-KChIP1 groups, in interneurons (*B*) and pyramidal cells (*C*).



## CHAPITRE V. DISCUSSION GENERALE

---

### 5.1 RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

Le rythme thêta constitue l'état « en ligne » de l'hippocampe (Buzsaki 2002), cette structure importante pour la mémoire déclarative (Milner et al. 1998). Dans la région CA1 de l'hippocampe, les interneurons inhibiteurs LM/RAD démontrent une activité oscillatoire (OPM) intrinsèque qui pourrait se révéler critique pour la génération du rythme thêta (Chapman & Lacaille 1999a; Chapman & Lacaille 1999b). Avant d'entamer les travaux de cette thèse, il était connu que des courants ioniques  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  dépendants du voltage étaient responsables de l'activité rythmique dans les interneurons. De plus, des indications pharmacologiques préliminaires ont suggéré que le courant  $\text{K}^+ I_A$  pourrait être impliqué (Chapman & Lacaille 1999b). Les travaux de cette thèse visaient à déterminer l'identité des sous-unités protéiques principales et auxiliaires qui sous-tendent le courant  $I_A$  dans les interneurons LM/RAD de la région CA1 de l'hippocampe chez le rongeur, en plus d'évaluer la contribution fonctionnelle de ce courant.

Tel que présenté dans les chapitres de résultats (III et IV), nous avons tout d'abord déterminé que le courant  $I_A$  contribue à la génération des OPM dans les interneurons LM/RAD de l'hippocampe et que la protéine Kv4.3 forme des canaux qui contribuent à ce courant. Dans un second temps, les mécanismes qui régissent les interactions entre les sous-unités principales de canaux Kv4.3 et les protéines accessoires KChIP1 ont été précisés alors qu'il a été montré que la protéine KChIP1 module le courant  $I_A$ -Kv4.3 et la fréquence de décharge de potentiels d'action dans les interneurons de l'hippocampe.

Dans la discussion générale qui suit, la contribution de nos résultats à l'avancement de connaissances ainsi que des perspectives de recherches futures seront discutées.

## 5.2 IDENTITE DES CANAUX A LA BASE DU COURANT $I_A$ DANS LES INTERNEURONES

### 5.2.1 DES CANAUX Kv4.3 HOMOMERIQUES DANS LES INTERNEURONES LM/RAD ?

Il est aujourd'hui incontestable que des sous-unités  $\alpha$  Kv4 forment des canaux qui soutiennent le courant  $I_A$  somatodendritique dans plusieurs populations de neurones du système nerveux. Il a été possible d'arriver à cette conclusion en partie grâce à des travaux qui ont utilisé la surexpression neuronale d'un plasmide codant pour une protéine Kv4.2 mutée nommée Kv4.2W362F (Barry et al. 1998). Lorsque cette protéine s'associe à des sous-unités Kv4.2 ou Kv4.3 endogènes normales, il en résulte des canaux incapables de conduire le  $K^+$  (Barry et al. 1998). Ainsi, en surexprimant ce dominant négatif Kv4.2W362F et en évaluant l'effet sur le courant  $I_A$  résultant, la nécessité des sous-unités Kv4 pour le courant  $I_A$  natif a pu être révélée dans les neurones du cervelet (Shibata et al. 2000), les neurones des ganglions cervicaux supérieurs (Malin & Nerbonne 2001) et les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (Kim et al. 2005) ou du cortex visuel (Yuan et al. 2005).

Pour nos travaux dans les interneurones de l'hippocampe, nous avons plutôt fait appel à la transfection d'un ARNi ciblant spécifiquement l'expression de la protéine Kv4.3. Cette technique avantageuse nous a permis de démontrer que la sous-unité Kv4.3 contribue au courant  $I_A$  dans les interneurones LM/RAD. Nous avons également corrélié la présence d'un courant  $I_A$  proéminent avec l'expression somatodendritique de la protéine Kv4.3 dans les interneurones. En se basant sur nos observations et sur les patrons d'expression en immunocytochimie et en hybridation *in situ* des sous-unités Kv4 dans la région CA1 de l'hippocampe (qui révèlent une expression de Kv4.3 dans les interneurones et une absence apparente de Kv4.1 et Kv4.2 (Serodio & Rudy 1998 ; Rhodes et al. 2004 ; Vacher et al. 2008)), il serait tentant de conclure que des canaux Kv4.3 homomériques sont responsables du courant  $I_A$  dans les interneurones LM/RAD. Néanmoins, bien que nos résultats révèlent une contribution significative de la protéine Kv4.3 à la génération du courant  $I_A$  dans les interneurones, ils n'indiquent pas si cette sous-unité est exclusivement responsable du courant  $I_A$  dans ces cellules.

Effectivement, suite à la transfection biolistique de l'ARNi Kv4.3, nous avons observé une inhibition d'environ 60% de la densité du courant  $I_A$  dans les interneurones LM/RAD. Il est probable que l'inhibition de l'expression de la protéine Kv4.3 par cette technique ait été partielle et que des sous-unités Kv4.3 résiduelles aient pu générer les 40% restants du courant  $I_A$ . Pour vérifier si cette hypothèse est juste, le recours à des animaux transgéniques serait justifié. Dernièrement, une souris incapable d'exprimer la protéine Kv4.2 (Kv4.2<sup>-/-</sup>) a été générée. Elle a permis de mesurer la contribution exacte de la sous-unité Kv4.2 au courant  $I_A$  dans les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Hu et al. 2006) et dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Chen et al. 2006) et du cortex visuel (Nerbonne et al. 2008). La génération d'une souris transgénique incapable d'exprimer la protéine Kv4.3 (« knock-out » Kv4.3 ; Kv4.3<sup>-/-</sup>) serait un modèle de choix pour évaluer avec exactitude l'ampleur de la contribution des canaux Kv4.3 au courant  $I_A$  dans les interneurones LM/RAD.

Puis, une autre possibilité pourrait expliquer pourquoi environ 40% du courant  $I_A$  étaient toujours observé dans les interneurones LM/RAD, à la suite du traitement avec l'ARNi Kv4.3. En effet, il est concevable que d'autres canaux que des canaux Kv4 pourraient supporter une portion du courant  $I_A$  dans ces cellules inhibitrices. Comme mentionné dans l'introduction, l'expression hétérologue de certaines protéines des sous-familles Kv1 (Kv1.4) et Kv3 (Kv3.3 et Kv3.4) peut aussi engendrer des courants  $K^+$  transitoires rappelant le courant  $I_A$  neuronal (Song 2002 ; Jerng et al. 2004a). De plus, la co-expression hétérologue de protéines accessoires Kv $\beta$ 1 et Kv $\beta$ 3 avec des sous-unités principales Kv1 qui s'inactivent habituellement lentement, peut engendrer des canaux à inactivation rapide de type «  $I_A$  » (Jerng et al. 2004a).

Néanmoins, il semble improbable que des canaux formés des sous-unités Kv3.3 et Kv3.4 puissent expliquer la portion restante du courant  $I_A$  que nous avons observée dans les interneurones transfectés avec l'ARNi Kv4.3. En effet, les canaux Kv3 sont hautement sensibles à la TEA, drogue que nous avons appliquée durant les enregistrements de courants  $K^+$ , dans le but de mieux isoler la composante rapide  $I_A$ . Par contre, la présence possible de canaux Kv1 somatodendritiques dans les interneurones LM/RAD est davantage compatible avec nos observations. Tout d'abord, des travaux en

immunocytochimie ont révélé des signaux pour les protéines Kv1.1, Kv1.4, Kv1.6, Kv $\beta$ 1 et Kv $\beta$ 2 dans les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe (Rhodes et al. 1997) alors qu'il est connu qu'en système recombinant, les protéines accessoires Kv $\beta$ 1 et les sous-unités  $\alpha$  Kv1.1 et Kv1.4 peuvent former des canaux K<sup>+</sup> hétéromères qui s'inactivent rapidement et sont sensibles à la DTX (Ruppersberg et al. 1990 ; Jerng et al. 2004a). De plus, des évidences pharmacologiques récentes provenant de notre laboratoire démontrent que les interneurons possèdent un courant somatique K<sup>+</sup> sensible à la dendrotoxine (I<sub>D</sub>) qui s'inactivent relativement rapidement (Morin et al.; sous presse). Ainsi, il est envisageable que des canaux Kv1 soient à la base d'une portion du courant I<sub>A</sub> dans les interneurons. Pour vérifier expérimentalement cette hypothèse, l'approche que nous avons utilisée pour évaluer la contribution de la sous-unité Kv4.3 au courant I<sub>A</sub> pourrait être réutilisée mais cette fois-ci, en transfectant des ARNi inhibant l'expression des sous-unités Kv1.1, Kv1.4 ou Kv1.6. Les contributions de ces protéines à la génération du courant I<sub>A</sub> dans les interneurons pourraient alors être évaluées en électrophysiologie. Également, l'utilisation d'animaux transgéniques serait à nouveau appropriée pour vérifier l'hypothèse. Par contre, il serait complexe et coûteux de générer une multitude de souris transgéniques de type « knock-out » mais l'utilisation de la souris Kv1.1<sup>-/-</sup>, commercialement disponible (Jackson Laboratory, ME), pourrait être un début.

### **5.2.2 DISTRIBUTION ET TRAFIC DES CANAUX Kv4.3 DANS LES INTERNEURONES**

Des évidences récentes démontrent que plusieurs canaux formés de sous-unités Kv4 se regroupent dans les membranes plasmiques neuronales (Alonso & Widmer 1997 ; Kollo et al. 2006 ; Burkhalter et al. 2006). Par exemple, dans le cortex visuel, des agrégats somatodendritiques de canaux Kv4.2 et Kv4.3 sont retrouvées dans les cellules pyramidales et gabaergiques (Burkhalter et al. 2006). Dans ce cas, les agrégats de canaux Kv4 sont absentes de la membrane plasmique postsynaptique au niveau des synapses excitatrices mais présentes au niveau des synapses inhibitrices (Burkhalter et al. 2006). De tels résultats suggèrent que les canaux Kv4 pourraient être distribués de manière sélective dans différents types cellulaires et/ou à différentes synapses d'un même neurone, pour leur permettre de jouer des rôles spécialisés. Par ailleurs, il a dernièrement été révélé que

l'activité synaptique peut moduler le trafic membranaire des canaux Kv4 dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Kim et al. 2007 ; Lei et al. 2009). En effet, l'activation de récepteurs glutamatergiques AMPA dans ces cellules engendre une redistribution des canaux Kv4.2 (éloignement des sites synaptiques et accumulation dans les épines dendritiques) et une internalisation de canaux Kv4.2 (Kim et al. 2007). L'internalisation est dépendante des récepteurs NMDA et de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire (Kim et al. 2007). Elle nécessite aussi la phosphorylation du site Ser522 de la protéine Kv4.2 par la protéine kinase A (PKA) (Hammond et al. 2008).

Dans les interneurones LM/RAD, nos travaux en immunocytochimie et en microscopie confocale révèlent une distribution non uniforme des canaux Kv4.3 et soulève ainsi des perspectives intéressantes pour des investigations futures. Notamment, des travaux de microscopie électronique sur tranche d'hippocampe pourraient permettre d'obtenir une meilleure résolution de la distribution des sous-unités Kv4.3 à la membrane des interneurones LM/RAD et donc, de pouvoir étudier la présence d'agrégats de canaux Kv4.3 dans ces cellules. La modulation par l'activité (application d'ACh, de glutamate, etc.) de la distribution et du trafic membranaire des canaux Kv4.3 dans les interneurones pourrait être étudiée à l'aide d'interneurones dissociés maintenus en culture. Ces interneurones pourraient être transfectés avec un plasmide menant à l'expression de sous-unités Kv4.3-GFP pouvant être suivies en imagerie. Finalement, des tranches d'hippocampe pourraient être traitées à l'aide de neurotransmetteurs, fixées, puis préparées pour la microscopie électronique. Les effets des traitements sur les patrons de distribution des canaux Kv4.3 (et sur le courant  $I_A$  en électrophysiologie) dans les interneurones LM/RAD pourraient être évalués.

### **5.2.3 REGULATION DEVELOPPMENTALE DES CANAUX $I_A$**

Nos enregistrements du courant  $I_A$  dans les interneurones ont été effectués à partir de tranches d'hippocampe provenant d'animaux de groupes d'âges limités (P16 à P30 pour les tranches aiguës et P7 à P12 pour les tranches maintenues en culture). Pourtant, des études ont démontré que, dans certaines populations de neurones, la contribution du

courant  $I_A$  au courant sortant total pouvait varier au cours du développement. À titre d'exemple, dans les neurones cholinergiques non épineux du striatum, une plus grande densité de courant  $I_A$  est enregistrée dans les premiers jours postnataux (P1-P3) que chez les animaux plus âgés (Deng et al. 2004). De plus, dans les cellules pyramidales de l'hippocampe, un phénomène similaire existe puisque la densité du courant  $I_A$  diminue progressivement au cours des premières semaines suivant la naissance (Costa et al. 1994) (Klee et al. 1995) et une modification de la dépendance au voltage de l'activation et de l'inactivation du courant est observée (Costa et al. 1994). Dans les interneurons LM/RAD de l'hippocampe, peu de choses sont connues au sujet de l'évolution de la contribution du courant  $I_A$  dans le développement. Il serait de ce fait pertinent d'entamer des travaux afin d'évaluer les propriétés du courant  $I_A$  dans les interneurons à différents âges postnataux. Dans le cas où des différences seraient observées, les mécanismes sous-jacents pourraient être investigués. Plus précisément, les questions suivantes pourraient être abordées : (1) Est-ce que des changements dans les niveaux d'expression des sous-unités Kv4.3 surviennent dans les interneurons LM/RAD au cours du développement? (2) Est-ce que des sous-unités Kv4.1 et Kv4.2 sont exprimées dans ces interneurons à certains stages du développement? (3) Existe-t-il des différences dans la modulation des canaux Kv4.3 (par leur état de phosphorylation ou par des protéines accessoires) selon l'âge des animaux?

### **5.3 BASE IONIQUE ET IMPORTANCE DES OPM DANS LES INTERNEURONES LM/RAD**

#### **5.3.1 MECANISME IONIQUE DE GENERATION DES OPM DANS LES INTERNEURONES**

Diverses populations neuronales présentent des OPM ou des propriétés de résonance sous le seuil des potentiels d'action, dans le domaine de fréquence  $\theta$ . Toutefois, les mécanismes ioniques à la base de ces formes d'activité rythmique diffèrent selon le type cellulaire (Alonso & Llinas 1989 ; Hu et al. 2002 ; Leung & Yim 1991). Dans les interneurons LM/RAD de l'hippocampe, des travaux initiaux ont identifié un mécanisme de génération des OPM reposant sur des conductances  $Na^+$  (sensibles à la TTX) et  $K^+$

(résistantes à la TEA mais sensibles à la 4-AP) (Chapman & Lacaille 1999b). Les résultats de la présente thèse ont permis d'accroître la compréhension de ce mécanisme ionique.

Tout d'abord, en utilisant un bloqueur spécifique du courant  $I_h$ , nous avons déterminé que ce courant cationique n'est pas essentiel pour la genèse des OPM dans les interneurones. Cette observation est en accord avec les indications pharmacologiques préliminaires montrant une résistance des OPM à l'application extracellulaire de  $Cs^+$ , un bloqueur non spécifique du courant  $I_h$  (Chapman & Lacaille 1999b). Toutefois, ces résultats sont en contraste avec les rôles importants du courant  $I_h$  dans la génération d'activité rythmique dans les cellules stellaires du cortex entorhinal (Klink & Alonso 1993) et dans les cellules pyramidales hippocampiques (Hu et al. 2002). D'ailleurs, dans ces cellules pyramidales de l'hippocampe, il a été montré que le courant  $I_M$  est également nécessaire pour la résonance thêta sous le seuil des potentiels d'action (Hu et al. 2002). Nos résultats dans les interneurones LM/RAD sont aussi en opposition avec un tel rôle car ils indiquent que le courant  $I_M$  n'est pas indispensable pour l'apparition d'OPM.

Ensuite, en jumelant une approche pharmacologique à des outils moléculaires, nous avons démontré que le courant  $I_A$  dans les interneurones (et plus particulièrement le courant  $I_A$  soutenu par des canaux  $Kv4.3$ ) est critique pour la génération des OPM, en plus de suggérer une implication possible du courant  $I_D$ . Tel que décrit précédemment dans la discussion générale, des travaux récents effectués dans notre laboratoire ont confirmé la présence d'un courant  $I_D$  somatique dans les interneurones LM/RAD. De plus, il a été démontré que le blocage de ce courant  $I_D$  conduit à une inhibition de l'amplitude des OPM, ce qui prouve l'importance de cette conductance pour l'activité rythmique dans les interneurones (Morin et al.; sous presse). Finalement, en se basant sur toutes les évidences expérimentales disponibles sur les OPM dans les interneurones LM/RAD, il est possible de récapituler comme suit :

- (1) les OPM dépendent de l'apport des courants  $Na^+$  sensibles à la TTX,  $I_A$  et  $I_D$ .
- (2) les OPM ne dépendent pas de manière critique des courants  $K^+$  sensibles à la TEA ( $I_{Kfast}$ ,  $I_{Kslow}$ ) ou des courants  $I_h$  et  $I_M$ .

La caractérisation des propriétés biophysiques des courants  $K^+$  dans les interneurones LM/RAD a dernièrement permis de générer un modèle computationnel (Morin et al. ; sous presse). En effet, il a été déterminé en électrophysiologie que le courant  $I_A$  présente la plus importante contribution relative au courant  $K^+$  total dans ces interneurones. Puis, le modèle a permis d'évaluer davantage la contribution des différentes conductances ioniques à la génération de l'activité rythmique dans les interneurones. Les premières évidences suggèrent que les OPM dépendent largement de l'apport des courants sodique persistant ( $I_{NaP}$ ) et potassique  $I_A$ , ce qui concorde avec les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse. Les efforts de modélisation proposent aussi que les courants  $I_{Kfast}$ ,  $I_{Kslow}$  et  $I_D$  seraient actifs durant les OPM dans les interneurones. Les courants  $I_A$  et  $I_D$  seraient les conductances les plus actives aux potentiels membranaires s'approchant du seuil des potentiels d'action. Ces observations récentes, jumelées à nos résultats expérimentaux, permettent maintenant de mieux comprendre le mécanisme ionique à la base des OPM dans les interneurones LM/RAD. De plus, ils ouvrent la voie à de nouveaux thèmes de recherche qui seront décrits dans les lignes qui suivent.

#### ***5.3.1.1 Contrôle des OPM par la modulation du courant $I_A$***

Une première thématique de recherche consisterait à vérifier si les OPM dans les interneurones LM/RAD peuvent être modulées par des changements dans les propriétés du courant  $I_A$ . En effet, il a été mentionné précédemment qu'une modulation du trafic membranaire des canaux Kv4 (dépendante de l'activité synaptique) a été identifiée dans les cellules pyramidales de l'hippocampe (Kim et al. 2007 ; Lei et al. 2009). Des expériences visant à déterminer si un mécanisme similaire de modulation du courant  $I_A$  par l'activité synaptique existe dans les interneurones LM/RAD ont aussi été suggéré dans une section précédente de la présente discussion. Or, si une telle internalisation des canaux Kv4.3 dépendante de l'activité a lieu dans les interneurones, il serait intéressant de vérifier son impact sur les OPM. Une modulation des OPM dans les interneurones par l'activité synaptique, via l'internalisation de canaux Kv4.3 et du courant  $I_A$ , pourrait révéler un mécanisme synaptique de contrôle de l'activité thêta hippocampique.



### ***5.3.1.2 Base moléculaire des courants $\text{Na}^+$ impliqués dans les OPM***

Un second thème pour de futures recherches est en lien avec nos résultats et les travaux de modélisation décrits préalablement qui suggèrent qu'un courant  $\text{Na}^+$  persistant  $I_{\text{NaP}}$  (sensible à la TTX) joue un rôle déterminant dans la génération de l'activité rythmique dans les interneurons LM/RAD. Peu de choses sont connues sur les propriétés biophysiques et l'identité moléculaire des courants  $\text{Na}^+$  dépendants du voltage dans les interneurons LM/RAD. Des différences entre les propriétés des courants  $\text{Na}^+$  dans les cellules pyramidales et celles d'une population d'interneurons du gyrus dentelé ont déjà été révélées (Martina & Jonas 1997). En électrophysiologie, il serait ainsi pertinent de caractériser les propriétés biophysiques et pharmacologiques des courants  $\text{Na}^+$  (Martina & Jonas 1997 ; French et al. 1990) dans les interneurons LM/RAD et vérifier si elles diffèrent de celles retrouvées dans d'autres populations neuronales de l'hippocampe. Pour ce qui est de l'aspect moléculaire, il a récemment été suggéré que des canaux différents de ceux qui soutiennent le courant  $\text{Na}^+$  transitoire seraient à la base du courant  $I_{\text{NaP}}$  (Ogata & Ohishi 2002). Plus spécifiquement, des canaux Nav1.6 soutiendraient la majorité du courant  $I_{\text{NaP}}$  dans les neurones (Ogata & Ohishi 2002 ; Royeck et al. 2008). En somme, l'hypothèse que des canaux Nav1.6 seraient à la base d'un courant  $\text{Na}^+$  persistant dans les interneurons LM/RAD pourrait être vérifiée.

Pour ce faire, la présence et la localisation de sous-unités Nav1.6 dans les interneurons devrait être élucidées en immunocytochimie et en microscopie confocale. Ces techniques ont déjà permis de révéler la présence de canaux Nav1.6 dans le segment initial de l'axone d'interneurons hippocampiques exprimant la PV (Lorincz & Nusser 2008). Suite à la révélation de canaux Nav1.6 et/ou d'autres types de canaux Nav dans les interneurons LM/RAD, une approche similaire à celle que nous avons utilisée pour évaluer la contribution de la protéine Kv4.3 au courant  $I_A$  et aux OPM pourrait être utilisée. En effet, une suppression spécifique de l'expression d'une sous-unité principale de canaux  $\text{Na}^+$  choisie pourra être obtenue par la transfection biolistique d'ARNi et couplée à l'analyse électrophysiologique des courants  $\text{Na}^+$  et des OPM dans les interneurons LM/RAD.

### 5.3.2 OPM DANS LES INTERNEURONES LM/RAD ET RYTHME THETA HIPPOCAMPIQUE

L'activité neuronale synchrone semble être une nécessité computationnelle pour le système nerveux central (Singer 1999) et les mécanismes cellulaires de génération et de maintien des patrons d'activité rythmique constituent, plus que jamais, un intérêt de recherche majeur (Singer 1999 ; Whittington & Traub 2003). Dans la région CA1 de l'hippocampe, un modèle « classique » expliquant la génération de l'activité thêta (décrit dans l'introduction générale) sert fréquemment de référence (Buzsaki 2002). Il a été précédemment exposé dans cette thèse que ce modèle « classique » semble sous-estimer la contribution des propriétés intrinsèques des neurones du réseau local hippocampique et, en particulier, des interneurones inhibiteurs. Dans ce contexte, une mise à jour du modèle « classique » permettant d'expliquer la génération du rythme thêta dans la région CA1 de l'hippocampe est proposée dans cette section (**Fig. 12**). Ce modèle intégré met davantage d'emphasis sur les contributions intrinsèques à l'hippocampe et inclut l'apport particulier des interneurones LM/RAD à ce processus.

#### 5.3.2.1 *Modèle intégré de génération du rythme thêta : contributions extrinsèques*

Premièrement, conformément à la description du modèle « classique », le SM-BDB agirait comme région génératrice de rythme. Cette région fournirait un apport extrinsèque à l'hippocampe par l'entremise d'inputs cholinergiques excitateurs (engendrant des PPSE dendritiques) aux cellules pyramidales et aux interneurones à panier de même que par des inputs gabaergiques inhibiteurs à ces mêmes interneurones à panier (Leranth & Frotscher 1987 ; Freund & Antal 1988 ; Buzsaki 2002). Il en résulterait une sommation de PPSI périsonatiques et de PPSE dendritiques dans les cellules pyramidales de la région CA1 (Buzsaki 2002). Il est à noter que les inputs extrinsèques du SM-BDB atteignant les interneurones à panier de l'hippocampe pourraient induire une décharge de potentiels d'action à fréquence thêta dans ces cellules. Cela mènerait à la génération de PPSI rythmiques et à une décharge (par rebond) rythmique dans les cellules pyramidales (Cobb et al. 1995). Ce processus inhibiteur contribuerait à la synchronisation de la décharge thêta de plusieurs cellules pyramidales.

Puis, d'autres inputs extrinsèques à l'hippocampe, ceux-ci provenant du cortex enthorinal, engendreraient des PPSE rythmiques dendritiques dans les cellules pyramidales hippocampiques (**Fig. 12A**) (Buzsaki 2002). Des apports intrinsèques à l'hippocampe mais extrinsèques à une région CA1 donnée pourraient aussi être impliqués. Par exemple, les cellules pyramidales de la région CA3 qui possèdent la capacité d'agir comme oscillateur thêta (MacVicar & Tse 1989 ; Fischer et al. 1999) engendreraient aussi des PPSE rythmiques dendritiques dans les cellules pyramidales de la région CA1 (par la voie des collatérales de Schaffer). Finalement, des signaux provenant de la région CA1 controlatérale contribueraient également à la synchronisation de la décharge thêta (Kunkel et al. 1988 ; Andersen 2007).

### ***5.3.2.2 Modèle intégré de génération du rythme thêta : contributions intrinsèques***

Différentes propriétés du réseau neuronal intrinsèque à la région CA1 participeraient à la génération du rythme thêta. Comme mentionné préalablement, durant la rédaction de cette thèse, des travaux récents ont démontré l'existence d'oscillateurs thêta intrinsèques à la région CA1 (Goutagny et al.; sous presse). Ces travaux ont de plus dévoilé que la rythmicité thêta CA1 générée de manière intrinsèque est indépendante de l'activité cholinergique mais dépendante de la transmission synaptique rapide glutamatergique et gabaergique (Goutagny et al.; sous presses). Ainsi, sans renier l'importance des inputs extrinsèques à l'hippocampe, il semble que des interactions neuronales impliquant les cellules pyramidales et inhibitrices de la région CA1 contribueraient à la génération d'au moins une partie de l'activité thêta. La nature exacte de ces oscillateurs locaux n'est pas encore établie. Certaines propriétés des neurones de la région CA1 pourraient soutenir de telles interactions en plus de contribuer à l'intégration des inputs extrinsèques dans un contexte global de génération du rythme thêta et seront maintenant décrites.

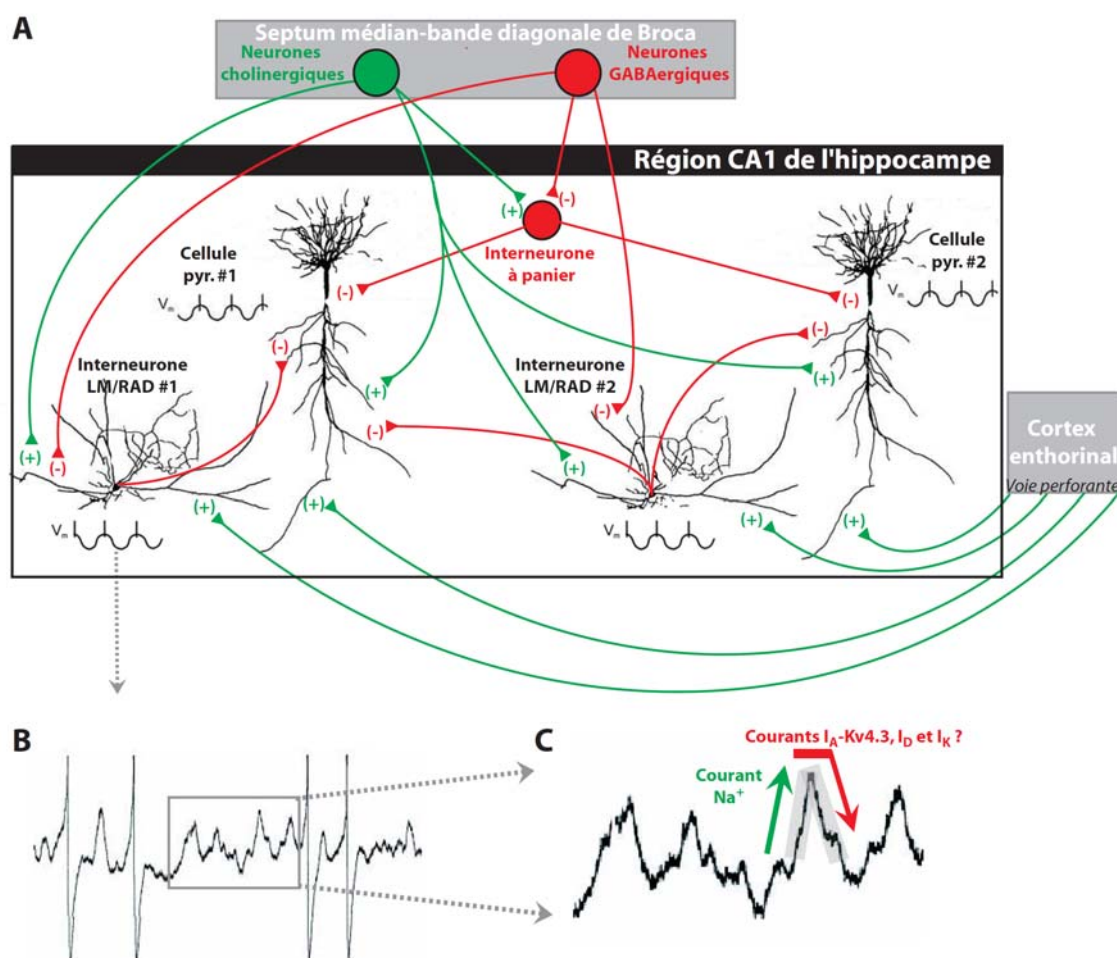
**OPM dans les cellules pyramidales.** Tout d'abord, les cellules pyramidales de la région CA1 doivent intégrer plusieurs signaux excitateurs (provenant entre autres du SM-BDB et du cortex entorhinal) mais aussi des signaux inhibiteurs (provenant de différents interneurons locaux) (**Fig. 12A**). Il est probable que cette intégration soit modulée par les OPM pouvant être retrouvées dans les cellules pyramidales (**Fig. 12A**) (Leung & Yim

1991). De plus, la présence d'états de résonance dans le domaine fréquences thêta dans cette population neuronale (Hu et al. 2002) suggèrent que les cellules pyramidales pourraient soutenir une décharge de potentiels d'action dans le domaine thêta dans certaines conditions physiologiques.

**OPM dans les interneurones LM/RAD.** Dernièrement, l'idée voulant que les interneurones inhibiteurs seraient critiques pour la synchronisation de l'activité rythmique des cellules principales est de plus en plus répandue (Whittington & Traub 2003; Klausberger 2009). Notamment, dans la région CA1 de l'hippocampe, les interneurones LM/RAD pourraient être importants pour la génération et/ou la modulation du rythme thêta. En effet, ces cellules reçoivent à la fois des inputs extrinsèques excitateurs (cholinergiques) et inhibiteurs (gabaergiques) du SM-BDB (Leranth & Frotscher 1987 ; Freund & Antal 1988). Les afférences cholinergiques pourraient dépolariser les interneurones LM/RAD et induire des OPM au rythme thêta (**Fig. 12A-B**). Les OPM seraient dépendantes de conductances  $I_{NaP}$ ,  $I_{A-Kv4.3}$  et  $I_D$ . La conductance  $Na^+$   $I_{NaP}$  serait responsable de la phase dépolarisante alors que les courants  $K^+$   $I_A$ ,  $I_D$  (et probablement  $I_{Kslow}$  et  $I_{Kfast}$ ) pourraient : (1) permettre le maintien de la cellule à des potentiels membranaires auxquels les OPM peuvent prendre place ; (2) freiner la dépolarisation initiale ou (3) contribuer à la repolarisation membranaire (**Fig. 12C**). Des OPM reposant sur ce mécanisme pourraient soutenir une décharge rythmique de potentiels d'action dans le domaine de fréquences thêta dans les interneurones LM/RAD (Chapman & Lacaille 1999a). Cela induirait des PPSI rythmiques dans les cellules pyramidales du CA1, via l'activation de récepteurs  $GABA_A$  localisés sur les dendrites apicales de ces dernières (Chapman & Lacaille 1999a ; Bertrand & Lacaille 2001). Les PPSI rythmiques dans les cellules pyramidales seraient suivis de dépolarisations par rebond favorisant la décharge rythmique de potentiels d'action dans ces cellules. Cette décharge serait déphasée de  $180^\circ$  par rapport à celle des interneurones (**Fig. 12A**) (Chapman & Lacaille 1999a). Chaque interneurone LM/RAD pourrait inhiber rythmiquement plusieurs cellules pyramidales et contribuer à la synchronisation de la décharge thêta d'une grande population de neurones. De plus, il a récemment été démontré que des interneurones LM/RAD peuvent être électriquement couplés (Zsörös & Maccaferri 2005), ce qui pourrait permettre à plusieurs

interneurones de se synchroniser et contrôler la décharge d'une grande population de cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe.

**Patrons de décharge des interneurones inhibiteurs.** Des évidences récentes ont établi que, chez le rat anesthésié, des interneurones de différentes classes de la région CA1 de l'hippocampe et innervant différents domaines des cellules pyramidales, déchargent selon des patrons stéréotypés durant le rythme thêta. Cela suggère des contributions au rythme thêta différentes selon la classe d'interneurone considérée (Klausberger et al. 2003 ; Klausberger et al. 2004 ; Klausberger 2009). Par exemple, la plupart des interneurones ciblant les dendrites des cellules pyramidales déchargent lors du creux des oscillations du rythme thêta (enregistré en potentiels de champs locaux dans la couche de cellules pyramidales), c'est-à-dire, au même moment qu'un grand nombre de cellules pyramidales sont actives (Klausberger et al. 2003 ; Klausberger et al. 2004 ; Klausberger et al. 2005). C'est le cas des cellules O-LM exprimant la PV (classe #6) (**Fig. 3**). Ces interneurones ne fourniraient pas l'inhibition responsable de la phase silencieuse du cycle thêta mais moduleraient plutôt l'intégration des inputs excitateurs lorsque les cellules pyramidales sont actives (Klausberger 2009). D'autres classes d'interneurones déchargent plutôt lors des phases ascendante ou descendante d'un cycle thêta extracellulaire. L'action complémentaire des différentes classes d'interneurones pourrait déterminer la dynamique de l'activité de groupe de cellules pyramidales.



**FIGURE 12. Modèle intégré de génération du rythme thêta dans la région CA1 de l'hippocampe**

*A*, Le SM-BDB et le cortex entorhinal fournissent des apports extrinsèques. Des cellules pyramidales et des interneurons démontrent des OPM qui permettent de soutenir leur décharge rythmique. Diverses interactions excitatrices et inhibitrices dans le réseau neuronal de la région CA1 de l'hippocampe sont illustrées. *B*, Les OPM intrinsèques permettent de contrôler la décharge rythmique dans un interneuron LM/RAD. *C*, Mécanisme ionique à la base des OPM dans les interneurons LM/RAD. Figure adaptée de Morin et al. (1996), Chapman & Lacaille (1999b) et Buzsaki (2002).

## 5.4 COMPLEXE MACROMOLECULAIRE Kv4 DANS LES INTERNEURONES

L'observation que l'expression de canaux Kv4 en système recombinant mène à des courants  $I_A$  dont les propriétés sont différentes des courants  $I_A$  natifs a mené à de multiples efforts au cours des dernières années pour identifier et caractériser des protéines accessoires à ces canaux (Maffie & Rudy 2008). Présentement, il semble incontestable que des protéines auxiliaires modulent les caractéristiques des canaux  $I_A$  dans les neurones (Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004 ; Maffie & Rudy 2008). Ce constat repose principalement sur des travaux de co-expression en système hétérologue de combinaisons de sous-unités Kv4 avec des protéines accessoires identifiées dans les neurones (Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004 ; Rhodes et al. 2004). D'autres travaux ont également évalué la contribution de protéines auxiliaires au courant  $I_A$  et à la fonction de certaines cellules natives (Kuo et al. 2001 ; Liss et al. 2001 ; Lilliehook et al. 2003 ; Anderson et al.; sous presse). La seconde section de résultats expérimentaux de cette thèse s'insère dans la lignée de ces quelques travaux puisqu'elle identifie une nouvelle contribution de la protéine KCHIP1 au courant  $I_A$  et à la fonction des interneurones LM/RAD hippocampiques.

### 5.4.1 RECUPERATION DE L'INACTIVATION DU COURANT $I_A$ DANS LES INTERNEURONES

En raison de son implication dans la décharge rythmique de potentiels d'action, la rapidité de la récupération de l'inactivation du courant  $I_A$  neuronal constitue une caractéristique essentielle de cette conductance  $K^+$  (Maffie & Rudy 2008). Dans les neurones, les sous-unités principales de canaux Kv4 sont partiellement responsables de cette rapidité de récupération. Effectivement, des expériences en système hétérologue ont démontré que l'inactivation des canaux Kv4 (à partir de potentiels hyperpolarisés) peut être levée relativement rapidement, en quelques dizaines ou centaines de millisecondes (Covarrubias et al. 2008). Les autres canaux Kv nécessitent généralement plus de temps pour récupérer de l'inactivation (jusqu'à plusieurs dizaines de secondes) (Covarrubias et al. 2008). Toutefois, cette caractéristique intrinsèque aux canaux Kv4 apparaît insuffisante pour expliquer les taux ultrarapides de récupération de l'inactivation des courants  $I_A$  natifs (les

courants Kv4 recombinants récupérant plus lentement de l'inactivation que la plupart des courants  $I_A$  enregistrés dans les neurones) (Jerng et al. 2004a ; Maffie & Rudy 2008).

#### ***5.4.1.1 Importance de la protéine accessoire KChIP1***

Au cours de la dernière décennie, des protéines accessoires pouvant accélérer la récupération de l'inactivation des canaux Kv4 ont été identifiées. Des expériences en système recombinant ont démontré que la co-expression de ces protéines, de la famille KChIP, résultait en des courants  $I_A$  dont les taux de récupération de l'inactivation approchaient des valeurs retrouvées chez les courants  $I_A$  natifs (An et al. 2000). Depuis, les effets des membres de la famille KChIP sur la récupération de l'inactivation des courants Kv4 recombinants ont été caractérisés en détails en système hétérologue (Hatano et al. 2002) (Patel et al. 2002 ; Takimoto et al. 2002 ; Jerng et al. 2004a ; Birnbaum et al. 2004). Dans la lignée de cette caractérisation, notre étude dans les cellules HEK293 a confirmé que la protéine KChIP1 accélère la récupération de l'inactivation des courants Kv4.3 recombinants. Ces évidences nous ont poussées à formuler l'hypothèse que la protéine KChIP1, qui est exprimée dans les interneurons hippocampiques, pourrait moduler la récupération de l'inactivation du courant  $I_A$ -Kv4.3 dans les interneurons.

En utilisant une approche technique similaire à celle développée pour la première partie expérimentale, nous avons démontré pour la première fois qu'une protéine accessoire aux canaux Kv4 module la récupération de l'inactivation du courant  $I_A$  dans les interneurons LM/RAD de l'hippocampe. Effectivement, nos résultats indiquent qu'une inhibition du niveau d'expression de la protéine accessoire KChIP1 ralentie la récupération de l'inactivation du courant  $I_A$ -Kv4.3 natif. De plus, ils suggèrent que la propriété de KChIP1 d'augmenter la vitesse de récupération de l'inactivation fournit un plus grand contrôle inhibiteur de la fréquence de décharge de potentiels d'action lors d'une activité soutenue. Nos observations sont ainsi compatibles avec l'idée voulant qu'un complexe macromoléculaire (incluant des sous-unités  $\alpha$  Kv4.3 et  $\beta$  KChIP1) sous-tende le courant  $I_A$  dans les interneurons.



#### **5.4.1.2 Mécanisme d'interaction Kv4.3/KChIP1**

Des efforts récents jumelant biologie moléculaire, physiologie, imagerie et cristallographie ont permis de mieux comprendre les principes généraux qui régissent les associations Kv4/KChIP recombinantes (Scannevin et al. 2004 ; Zhou et al. 2004). En particulier, des travaux ont étudié les interactions entre Kv4.3 et KChIP1, les sous-unités co-exprimées dans les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe (An et al. 2000 ; Hatano et al. 2002 ; Rhodes et al. 2004 ; Pioletti et al. 2006 ; Cui et al. 2008). Ces efforts et les nôtres ont permis d'identifier des domaines de Kv4.3 et de KChIP1, qui sont nécessaires pour des interactions efficaces entre ces deux protéines. Tout d'abord, il a été déterminé que les domaines fonctionnels en main EF (pouvant lier le  $\text{Ca}^{2+}$ ) des protéines KChIP1 sont nécessaires (Pioletti et al. 2006). Il a été suggéré que la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à ces domaines permettrait aux protéines de la famille KChIP de conserver une conformation adéquate leur permettant d'interagir efficacement avec les sous-unités Kv4 (An et al. 2000 ; Hasdemir et al. 2005 ; Pioletti et al. 2006). Deuxièmement, une molécule unique de KChIP1 fixerait la région N-terminale de deux sous-unités Kv4.3 dans un complexe macromoléculaire Kv4.3/KChIP1 selon un ratio 4:4 (Pioletti et al. 2006 ; Wang et al. 2007).

Malgré les importants progrès réalisés dans le domaine des interactions Kv4.3/KChIP1, le processus précis par lequel les protéines KChIP1 modulent la récupération de l'inactivation des canaux Kv4.3 recombinants, et possiblement celle des canaux Kv4.3 dans les interneurons LM/RAD, reste méconnu. Qui plus est, une controverse existe toujours au sujet du mécanisme d'inactivation même des canaux Kv4 (Rasmusson et al. 1998 ; Covarrubias et al. 2008). Ainsi, une meilleure compréhension du processus d'inactivation des canaux Kv4 permettra sans doute de mieux saisir le mécanisme de récupération de cette inactivation et subséquemment, la modulation de cette récupération par les protéines accessoires KChIP. Actuellement, une hypothèse stipule que les canaux Kv4 utiliseraient un mécanisme d'inactivation alternatif aux modes classiques d'inactivation retrouvés chez d'autres canaux  $\text{K}^+$  que sont l'inactivation de type N (reposant sur l'action d'un segment de la région N-terminale qui vient bloquer l'ouverture interne du pore) ou l'inactivation de type P/C (reposant sur l'action d'une portion transmembranaire venant bloquer l'ouverture externe du pore) (Rasmusson et al. 1998 ;

Jerng et al. 2004a ; Covarrubias et al. 2008). Cette hypothèse indique que le processus d'inactivation des canaux Kv4 serait plutôt analogue à celui des canaux HCN et reposerait sur l'activité d'une vanne (« gate ») interne contrôlant à la fois l'activation et l'inactivation. Le couplage électrochimique entre le senseur de voltage et la vanne dicterait quel état doit prendre le canal à un moment donné (Covarrubias et al. 2008). En somme, conjointement avec le perfectionnement des connaissances concernant le mécanisme d'inactivation des canaux Kv4, de futures études pourraient tenter de déterminer en détails comment les protéines KChIP modulent la récupération de l'inactivation des canaux Kv4 et, en particulier, par quel mécanisme moléculaire KChIP1 accélère la récupération de l'inactivation du courant  $I_A$ -Kv4.3 dans les interneurones LM/RAD.

En plus de nous permettre de mettre en évidence un rôle de la protéine KChIP1 dans les interneurones de l'hippocampe, nos résultats ont également permis de remarquer une discordance entre la modulation de multiples propriétés des courants Kv4.3 recombinants par KChIP1 et le fait qu'une seule propriété du courant  $I_A$  (la récupération de l'inactivation) ait été modifiée à la suite de l'inhibition de l'expression de KChIP1 dans les interneurones. Cette disparité suggère que des protéines accessoires additionnelles pourraient aussi intervenir dans la modulation du courant  $I_A$  dans les interneurones. Cette hypothèse et les perspectives de recherche qu'elle implique seront développées dans la section qui suit.

#### **5.4.2 PARTENAIRES ADDITIONNELS DU COMPLEXE KV4 DANS LES INTERNEURONES**

En comparant nos observations obtenues dans les interneurones LM/RAD de l'hippocampe à celles concernant la modulation des canaux Kv4.3 par KChIP1 en système hétérologue, un manque de correspondance fait surface. Premièrement, en système recombinant, la co-expression de KChIP1 avec la protéine Kv4.3 entraîne des effets multiples sur la fonction de Kv4.3 (augmentation du ciblage membranaire et de la densité du courant, accélération de la récupération de l'inactivation, ralentissement de la phase d'inactivation, déplacement des courbes d'activation/inactivation, modification du temps de montée et d'inactivation). Conséquemment, suite à une réduction du niveau de KChIP1 dans les interneurones, nous aurions pu nous attendre à plusieurs changements des

propriétés du courant  $I_A$ -Kv4.3. Pourtant, une seule des propriétés du courant  $I_A$  natif (le ralentissement de la récupération de l'inactivation) a changée. Nos résultats ne permettent pas de rejeter l'éventualité que la suppression de l'expression de KChIP1 dans les interneurons (par l'ARNi KChIP1) ait été incomplète et que les protéines KChIP1 restantes aient été suffisantes pour moduler certaines caractéristiques du courant  $I_A$  mais pas la récupération de l'inactivation. Toutefois, en se basant sur des travaux récents d'autres groupes qui seront maintenant décrits, une autre hypothèse reposant sur l'apport de protéines accessoires additionnelles devrait être fortement considérée.

#### ***5.4.2.1 Un complexe Kv4.3/KChIP1/DPPL dans les interneurons ?***

Récemment, plusieurs travaux ont étudié la modulation des courants Kv4 hétérologues par la co-expression simultanée de deux sous-unités  $\beta$ , une de la famille de KChIP et une autre de la famille des DPPL (Jerng et al. 2005 ; Jerng et al. 2007 ; Amarillo et al. 2008). Il a été remarqué que les courants Kv4/KChIP/DPPL résultants démontrent des propriétés (notamment le décours temporel de l'inactivation) qui ressemblent davantage à celles des courants  $I_A$  neuronaux que les propriétés des courants Kv4/KChIP ou Kv4/DPPL. Cela a mené à la suggestion qu'un complexe macromoléculaire impliquant des canaux Kv4, et des protéines accessoires KChIP et DPPL sous-tendraient le courant  $I_A$  neuronal (Nadal et al. 2003 ; Jerng et al. 2005 ; Amarillo et al. 2008 ; Covarrubias et al. 2008 ; Maffie & Rudy 2008). Une étude récente menée sur des cellules pyramidales de l'hippocampe, a menée à la proposition que des protéines accessoires des familles KChIP et DPPL pourraient exercer des effets régulateurs redondants sur le courant  $I_A$  dans ces cellules (Kim et al. 2008). Des observations faites par d'autres groupes vont aussi dans le sens de cette suggestion :

- (1) Dans les cardiomyocytes, exprimant normalement Kv4.2/Kv4.3 avec KChIP2 mais sans DPP10 et DPPX (deux protéines DPPL) ou d'autres KChIP (Serodio & Rudy 1998 ; Rhodes et al. 2004 ; Nadal et al. 2006), la suppression de KChIP2 engendre une perte totale du courant  $I_{to}$  (Kuo et al. 2001).

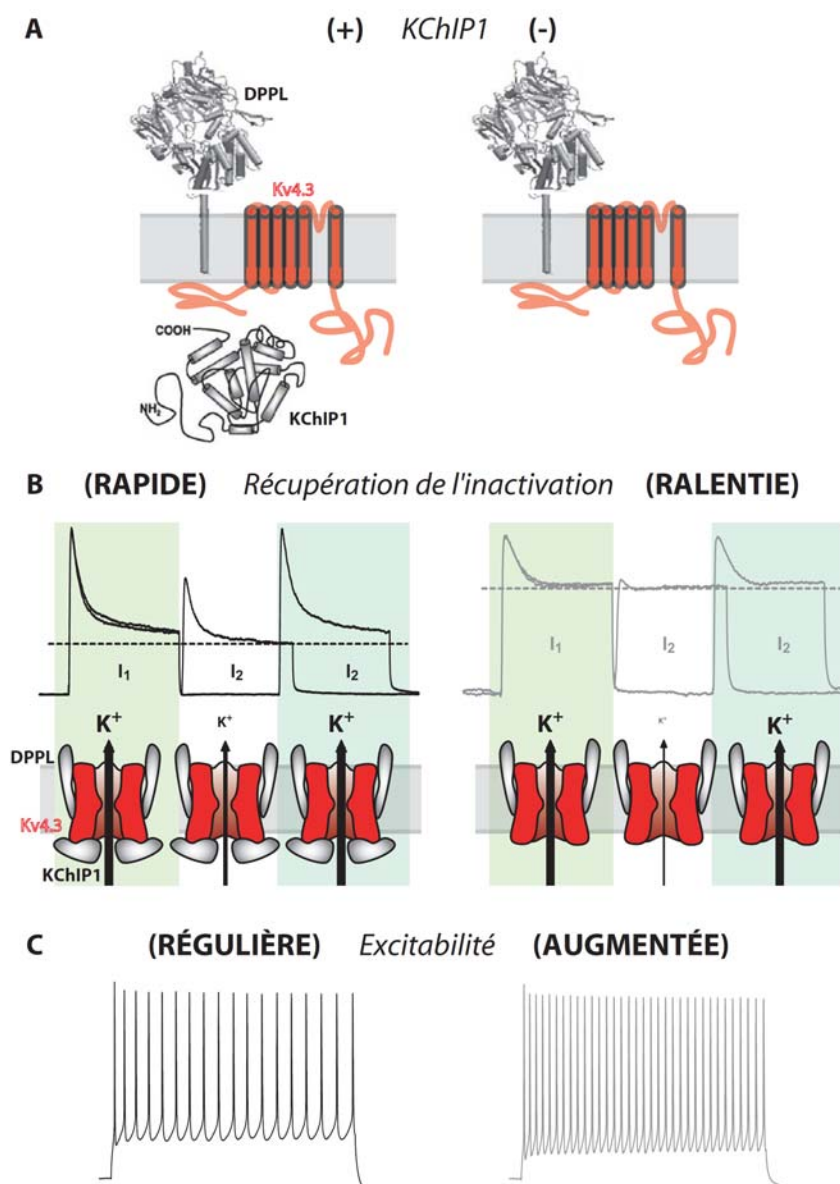
- (2) Dans les cellules granulaires du gyrus dentelé, exprimant typiquement Kv4.2/Kv4.3 avec KChIP2, 3 et 4 et DPPX, la suppression de KChIP3 engendre seulement une inhibition modeste du courant  $I_A$  (Lilliehook et al. 2003).

Si une diversité de protéines accessoires aux canaux Kv4 permet une compensation à la perte d'un type de protéine auxiliaire particulier, il est probable que des protéines accessoires additionnelles (des familles KChIP ou DPPL) dans les interneurons aient pu masquer les effets d'une suppression de KChIP1 dans ces cellules. Comme aucune autre sous-unité de la famille KChIP (que KChIP1) n'est exprimée dans les interneurons de la région CA1 de l'hippocampe, il faut se tourner vers la famille des DPPL pour trouver une protéine accessoire additionnelle. Ce pourrait être la protéine DPP10, exprimée dans les interneurons et capable d'induire des effets qui rappellent ceux induits par KChIP1 sur les courants Kv4.3 recombinants (Jerng et al. 2004b ; Zagha et al. 2005). Pour vérifier directement l'importance de DPP10 ou de toute autre protéine accessoire Kv4 au courant  $I_A$  (et à la fonction) des interneurons, une approche utilisant la transfection d'ARNi pourrait être utilisée à nouveau. De plus, si l'hypothèse voulant qu'un complexe Kv4.3/KChIP1/DPP10 soutient le courant  $I_A$  dans les interneurons s'avère juste, la suppression combinée de KChIP1 et DPP10 dans ces cellules devrait affecter maintes propriétés du courant  $I_A$  natif.

#### ***5.4.2.2 Modèle de la modulation du courant $I_A$ et de la fonction des interneurons par KChIP1***

Pour mieux représenter l'hypothèse venant d'être décrite, il est possible de schématiser les résultats qui nous ont permis d'identifier la contribution de KChIP1 au courant  $I_A$  et à la fonction des interneurons dans le contexte d'un complexe macromoléculaire (incluant des sous-unités principales de canaux Kv4.3 et des sous-unités accessoires KChIP1 et DPPL). Dans un tel scénario, la perte de KChIP1 pourrait mener au ralentissement de la récupération de l'inactivation du courant  $I_A$  alors que la présence de DPPL maintiendrait les autres propriétés du courant inchangé. Une récupération plus lente de l'inactivation signifie que moins de canaux seront disponibles pour une réactivation rapide. Ainsi, lors d'une activité neuronale soutenue, un plus faible contrôle inhibiteur de l'excitabilité sera

exercé par le courant  $I_A$  dans les interneurones et il en résultera une plus grande excitabilité par rapport à la condition régulière où le KChIP1 est normalement exprimé (voir modèle **Fig. 13**).



**FIGURE 13. Modulation du courant  $I_A$ -Kv4.3 et de la décharge dans les interneurons LM/RAD par KChIP1**

*A*, Représentation d'un complexe Kv4.3/KChIP1/DPPL (gauche) et d'un assemblage dans lequel la protéine accessoire KChIP1 est absente (droite). *B*, La présence de la protéine KChIP1 (gauche) permet une récupération accélérée de l'inactivation du courant  $I_A$ . *C*, Cette récupération de l'inactivation rapide permet un plus grand contrôle inhibiteur de la décharge en réponse à une activité soutenue (gauche), par rapport à la situation où la protéine KChIP1 est supprimée (droite). Figure adaptée de Birnbaum et al. (2004) et Vacher et al. (2008).

#### ***5.4.3.2 Protéines accessoires du complexe Kv4 : autres avenues de recherche***

Pour étudier la modulation du courant  $I_A$  dans les interneurons par la protéine KChIP1, nous avons eu recours, entre autres, à des enregistrements électrophysiologiques de « patch-clamp » en configuration cellule entière. Cette technique utile comporte certaines limites. Par exemple, il est possible que la suppression (par l'ARNi) de protéines KChIP1 ait modifié les patrons de ciblage membranaire de canaux Kv4.3 sans que le nombre total de canaux à la membrane somatodendritique n'ait été modifié. Nos enregistrements en configuration cellule entière n'auraient pu nous indiquer qu'un tel changement est survenu. Une redistribution des canaux Kv4.3 en absence de KChIP1 pourrait être envisageable puisque : (1) la protéine KChIP1 module le ciblage membranaire des protéines Kv4.3 en système hétérologue et (2) comme il a été décrit précédemment, les canaux Kv4 peuvent être distribués de manière non uniforme et/ou former des agrégats à la membrane plasmique des neurones (Alonso & Widmer 1997 ; Kollo et al. 2006 ; Burkhalter et al. 2006). Ainsi, il serait intéressant d'aborder la question suivante : est-ce que la protéine KChIP1 ou d'autres protéines accessoires (comme DPP10, par exemple) sont impliquées dans le ciblage des canaux Kv4.3 à des sites spécifiques de la membrane plasmique dans les interneurons LM/RAD de l'hippocampe ? Pour ce faire, il serait possible d'étudier en microscopie électronique, à partir de tranches organotypiques, l'effet de la transfection de l'ARNi KChIP1 sur la distribution des canaux Kv4.3 à la membrane des interneurons.

Une autre avenue de recherche en continuité avec les travaux de cette thèse consisterait à déterminer s'il existe une modulation calcique des propriétés du courant  $I_A$  dans les interneurons. En effet, il a été décrit que les protéines KChIP1 sont des senseurs de  $Ca^{2+}$ . Initialement, lors de leur identification à titre de protéines accessoires des canaux Kv4, la capacité des protéines KChIP de lier le  $Ca^{2+}$  a suscité beaucoup d'intérêt car elle laissait présager une modulation dépendante du  $Ca^{2+}$  du courant  $I_A$  via l'action de protéines accessoires KChIP (An et al. 2000 ; Patel et al. 2002). Pourtant, bien qu'il ait été reconnu que les sites de liaison du  $Ca^{2+}$  des protéines KChIP semblaient nécessaires pour qu'elles présentent une conformation fonctionnelle (Hasdemir et al. 2005 ; Pioletti et al. 2006), aucun groupe n'avait réussi à montrer, de manière convaincante, un tel lien jusqu'à très récemment. En effet, durant la rédaction de cette thèse, la démonstration d'une modulation

via KChIP3 du courant  $I_A$  par les niveaux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire a été faite dans les cellules étoilées (« stellate ») du cervelet. Dans ce cas, la protéine KChIP3 du complexe Kv4/KChIP percevrait l'entrée de  $Ca^{2+}$  par des canaux calciques de type T, ce qui déplacerait la courbe d'inactivation vers des potentiels plus dépolarisés (Anderson et al.; sous presse). Il y aurait donc interaction entre le complexe Kv4/KChIP et une conductance  $Ca^{2+}$  formant un complexe de signalisation plus large (Anderson et al.; sous presse). Ces nouvelles observations laissent présager que la capacité de lier le  $Ca^{2+}$  de KChIP1 pourrait fournir un mécanisme dynamique de modulation du courant  $I_A$ -Kv4.3 et donc de la fonction des interneurons de l'hippocampe. Il serait donc pertinent d'explorer cette possibilité en utilisant une approche similaire à celle utilisée par Anderson et al. (sous presse).

En somme, nos travaux concernant les interneurons LM/RAD hippocampiques ont permis d'identifier une contribution de la protéine accessoire KChIP1 à un complexe Kv4 natif. Cependant, plusieurs questions sur les bases moléculaires des courants  $I_A$ . Les multiples combinaisons d'expression de sous-unités principales de canaux Kv4 semblent pouvoir soutenir une grande variété de courants  $I_A$  dans différentes populations neuronales. De futures percées de ce domaine permettront sans doute de mieux saisir les paramètres qui permettent aux interneurons d'assurer des fonctions particulières dans l'hippocampe.



## 5.5 CONCLUSION GENERALE

En conclusion, les travaux de cette thèse ont contribué à l'avancement des connaissances dans le domaine de la modulation de l'excitabilité des interneurons inhibiteurs de l'hippocampe par les canaux  $K^+$  dépendants du voltage. Ils permettent de saisir davantage les processus qui soutiennent la fonction de l'hippocampe et possiblement de la mémoire chez les mammifères. Plus précisément, nos travaux ont révélé la nature des conductances ioniques responsables de la génération des OPM dans les interneurons LM/RAD, en démontrant la contribution notoire du courant  $K^+ I_A$ . De plus, nous avons déterminé l'identité moléculaire des canaux qui sous-tendent le courant  $I_A$  dans les interneurons. Finalement, nos efforts ont identifié un rôle de modulation du courant  $I_A$  par la protéine accessoire KChIP1, suggérant que ce courant est soutenu par un complexe Kv4.3/KChIP1 dans les interneurons de l'hippocampe. Cependant, plusieurs questions demeurent concernant les bases moléculaires du contrôle de l'excitabilité des neurones par les courants  $K^+$ . Les réponses à ces interrogations nous permettront sans doute de mieux comprendre comment les interneurons inhibiteurs contribuent à la génération du rythme thêta et à la fonction générale de l'hippocampe, ce qui permettra de mieux saisir les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la mémoire et l'apprentissage chez les mammifères.

## BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

---

**Acsady L, Gorcs TJ, Freund TF.** Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73: 317-334, 1996.

**Alonso A, Llinas RR.** Electrophysiology of the mammillary complex in vitro. II. Medial mammillary neurons. *J Neurophysiol* 68: 1321-1331, 1992.

**Alonso A, Llinas RR.** Subthreshold  $\text{Na}^+$ -dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342: 175-177, 1989.

**Alonso G, Widmer H.** Clustering of Kv4.2 potassium channels in postsynaptic membrane of rat supraoptic neurons: an ultrastructural study. *Neuroscience* 77: 617-621, 1997.

**Amaral DG.** A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182: 851-914, 1978.

**Amaral DG, Witter MP.** The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591, 1989.

**Amarillo Y, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Maffie J, Kwon E, Covarrubias M, Rudy B.** Ternary Kv4.2 channels recapitulate voltage-dependent inactivation kinetics of A-type  $\text{K}^+$  channels in cerebellar granule neurons. *J Physiol* 586: 2093-2106, 2008.

**An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ.** Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* 403: 553-556, 2000.

**Andersen P.** *The hippocampus book*. Oxford ; Toronto: Oxford University Press, 2007, 832 p.

**Anderson D, Mehaffey WH, Iftinca M, Rehak R, Engbers JD, Hameed S, Zamponi GW, Turner RW.** Regulation of neuronal activity by Cav3-Kv4 channel signaling complexes. *Nat Neurosci*, sous presse.

**Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsaki G, Cauli B, Defelipe J, Fairen A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvarday ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Munoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R.** Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9: 557-568, 2008.

- Bahring R, Dannenberg J, Peters HC, Leicher T, Pongs O, Isbrandt D.** Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem* 276: 23888-23894, 2001.
- Balser JR, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Perez-Garcia MT, Marban E, Tomaselli GF.** External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J Physiol* 494 ( Pt 2): 431-442, 1996.
- Barry DM, Xu H, Schuessler RB, Nerbonne JM.** Functional knockout of the transient outward current, long-QT syndrome, and cardiac remodeling in mice expressing a dominant-negative Kv4 alpha subunit. *Circ Res* 83: 560-567, 1998.
- Beck EJ, Bowlby M, An WF, Rhodes KJ, Covarrubias M.** Remodelling inactivation gating of Kv4 channels by KChIP1, a small-molecular-weight calcium-binding protein. *J Physiol* 538: 691-706, 2002.
- Bertrand S, Lacaille JC.** Unitary synaptic currents between lacunosum-moleculare interneurons and pyramidal cells in rat hippocampus. *J Physiol* 532: 369-384, 2001.
- Bilkey DK, Heinemann U.** Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in layer III/V perirhinal cortex neurons of the rat. *Hippocampus* 9: 510-518, 1999.
- Birnbaum SG, Varga AW, Yuan LL, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader LA.** Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. *Physiol Rev* 84: 803-833, 2004.
- Bixby KA, Nanao MH, Shen NV, Kreusch A, Bellamy H, Pfaffinger PJ, Choe S.** Zn<sup>2+</sup>-binding and molecular determinants of tetramerization in voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *Nat Struct Biol* 6: 38-43, 1999.
- Bland BH.** The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol* 26: 1-54, 1986.
- Bliss TV, Collingridge GL.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39, 1993.
- Bliss TV, Lomo T.** Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 331-356, 1973.
- Bodizs R, Kantor S, Szabo G, Szucs A, Eross L, Halasz P.** Rhythmic hippocampal slow oscillation characterizes REM sleep in humans. *Hippocampus* 11: 747-753, 2001.
- Boland LM, Jiang M, Lee SY, Fahrenkrug SC, Harnett MT, O'Grady SM.** Functional properties of a brain-specific NH<sub>2</sub>-terminally spliced modulator of Kv4 channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C161-170, 2003.

- Bourdeau ML, Morin F, Laurent CE, Azzi M, Lacaille JC.** Kv4.3-mediated A-type K<sup>+</sup> currents underlie rhythmic activity in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 27: 1942-1953, 2007.
- Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, Sattelle DB.** Structure and function of two-pore-domain K<sup>+</sup> channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci* 26: 361-367, 2005.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P.** Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368: 823-828, 1994.
- Bullock TH, Buzsaki G, McClune MC.** Coherence of compound field potentials reveals discontinuities in the CA1-subiculum of the hippocampus in freely-moving rats. *Neuroscience* 38: 609-619, 1990.
- Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J.** The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron* 35: 625-641, 2002.
- Burgoyne RD.** Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nat Rev Neurosci* 8: 182-193, 2007.
- Burkhalter A, Gonchar Y, Mellor RL, Nerbonne JM.** Differential expression of I(A) channel subunits Kv4.2 and Kv4.3 in mouse visual cortical neurons and synapses. *J Neurosci* 26: 12274-12282, 2006.
- Buzsaki G.** Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325-340, 2002.
- Buzsaki G.** Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus* 15: 827-840, 2005.
- Buzsaki G.** Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31: 551-570, 1989.
- Cantero JL, Atienza M, Stickgold R, Kahana MJ, Madsen JR, Kocsis B.** Sleep-dependent theta oscillations in the human hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 23: 10897-10903, 2003.
- Caplan JB, Madsen JR, Schulze-Bonhage A, Aschenbrenner-Scheibe R, Newman EL, Kahana MJ.** Human oscillations related to sensorimotor integration and spatial learning. *J Neurosci* 23: 4726-4736, 2003.
- Chapman CA, Lacaille JC.** Cholinergic induction of theta-frequency oscillations in hippocampal inhibitory interneurons and pacing of pyramidal cell firing. *J Neurosci* 19: 8637-8645, 1999a.

**Chapman CA, Lacaille JC.** Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of stratum lacunosum-moleculare. *J Neurophysiol* 81: 1296-1307, 1999b.

**Chen X, Yuan LL, Zhao C, Birnbaum SG, Frick A, Jung WE, Schwarz TL, Sweatt JD, Johnston D.** Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K<sup>+</sup> current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 26: 12143-12151, 2006.

**Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P.** Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378: 75-78, 1995.

**Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 233-285, 1999.

**Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M.** A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56: 2-5, 2009.

**Connor JA, Stevens CF.** Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J Physiol* 213: 31-53, 1971a.

**Connor JA, Stevens CF.** Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol* 213: 21-30, 1971b.

**Cope DW, Maccaferri G, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Somogyi P.** Cholecystokinin-immunopositive basket and Schaffer collateral-associated interneurons target different domains of pyramidal cells in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neuroscience* 109: 63-80, 2002.

**Costa PF, Santos AI, Ribeiro MA.** Potassium currents in acutely isolated maturing rat hippocampal CA1 neurones. *Brain Res Dev Brain Res* 83: 216-223, 1994.

**Cotella D, Jost N, Darna M, Radicke S, Ravens U, Wettwer E.** Silencing the cardiac potassium channel Kv4.3 by RNA interference in a CHO expression system. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 555-560, 2005.

**Covarrubias M, Bhattacharji A, De Santiago-Castillo JA, Dougherty K, Kaulin YA, Na-Phuket TR, Wang G.** The neuronal Kv4 channel complex. *Neurochem Res* 33: 1558-1567, 2008.

**Cui YY, Liang P, Wang KW.** Enhanced trafficking of tetrameric Kv4.3 channels by KChIP1 clamping. *Neurochem Res* 33: 2078-2084, 2008.

**Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM.** Action-potential propagation gated by an axonal I(A)-like K<sup>+</sup> conductance in hippocampus. *Nature* 389: 286-289, 1997.

**Deng P, Pang Z, Zhang Y, Xu ZC.** Developmental changes of transient potassium currents in large aspiny neurons in the neostriatum. *Brain Res Dev Brain Res* 153: 97-107, 2004.

**Dickson CT, Magistretti J, Shalinsky MH, Fransen E, Hasselmo ME, Alonso A.** Properties and role of I(h) in the pacing of subthreshold oscillations in entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 83: 2562-2579, 2000.

**Fan SH, Wong RK.** Selective expression of transient outward currents in different types of acutely isolated hippocampal interneurons. *J Neurophysiol* 76: 3563-3567, 1996.

**Fischer Y, Gahwiler BH, Thompson SM.** Activation of intrinsic hippocampal theta oscillations by acetylcholine in rat septo-hippocampal cocultures. *J Physiol* 519 Pt 2: 405-413, 1999.

**French CR, Sah P, Buckett KJ, Gage PW.** A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J Gen Physiol* 95: 1139-1157, 1990.

**Freund TF, Antal M.** GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336: 170-173, 1988.

**Freund TF, Buzsaki G.** Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470, 1996.

**Fries P, Nikolic D, Singer W.** The gamma cycle. *Trends Neurosci* 30: 309-316, 2007.

**Glasgow SD, Chapman CA.** Conductances mediating intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in layer II parasubicular neurons. *J Neurophysiol* 100: 2746-2756, 2008.

**Goldin AL.** Mechanisms of sodium channel inactivation. *Curr Opin Neurobiol* 13: 284-290, 2003.

**Goutagny R, Jackson J, Williams S.** Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci*, sous presse.

**Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L.** The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7: 364-372, 2004.

**Gu N, Hu H, Vervaeke K, Storm JF.** SK (KCa2) channels do not control somatic excitability in CA1 pyramidal neurons but can be activated by dendritic excitatory synapses and regulate their impact. *J Neurophysiol* 100: 2589-2604, 2008.

**Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI.** Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801-806, 2005.

- Hagiwara S, Kusano K, Saito N.** Membrane changes of Onchidium nerve cell in potassium-rich media. *J Physiol* 155: 470-489, 1961.
- Hammond RS, Lin L, Sidorov MS, Wikenheiser AM, Hoffman DA.** Protein kinase a mediates activity-dependent Kv4.2 channel trafficking. *J Neurosci* 28: 7513-7519, 2008.
- Hasdemir B, Fitzgerald DJ, Prior IA, Tepikin AV, Burgoyne RD.** Traffic of Kv4 K<sup>+</sup> channels mediated by KCHIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway. *J Cell Biol* 171: 459-469, 2005.
- Hasselmo ME.** What is the function of hippocampal theta rhythm?--Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus* 15: 936-949, 2005.
- Hatano N, Ohya S, Imaizumi Y.** Functional interaction between KCHIP1 and GFP-fused Kv4.3L co-expressed in HEK293 cells. *Pflugers Arch* 444: 80-88, 2002.
- Hille B.** *Ion channels of excitable membranes*. Sunderland, Mass.: Sinauer, 2001, p. xviii, 814 p.
- Hodgkin AL, Huxley AF.** Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116: 449-472, 1952.
- Hoffman DA, Magee JC, Colbert CM, Johnston D.** K<sup>+</sup> channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* 387: 869-875, 1997.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW.** Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250: 533-538, 1990.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW.** Two types of inactivation in Shaker K<sup>+</sup> channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 7: 547-556, 1991.
- Hrabetova S, Sacktor TC.** Transient translocation of conventional protein kinase C isoforms and persistent downregulation of atypical protein kinase Mzeta in long-term depression. *Brain Res Mol Brain Res* 95: 146-152, 2001.
- Hu H, Vervaeke K, Storm JF.** Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na<sup>+</sup> current in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 545: 783-805, 2002.
- Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, Gereau RWt.** The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 50: 89-100, 2006.
- Huerta PT, Lisman JE.** Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 15: 1053-1063, 1995.

**Hurst RS, Latorre R, Toro L, Stefani E.** External barium block of Shaker potassium channels: evidence for two binding sites. *J Gen Physiol* 106: 1069-1087, 1995.

**Hutcheon B, Yarom Y.** Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci* 23: 216-222, 2000.

**Huxter J, Burgess N, O'Keefe J.** Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. *Nature* 23: 828-32, 2003.

**Hyman JM, Wyble BP, Goyal V, Rossi CA, Hasselmo ME.** Stimulation in hippocampal region CA1 in behaving rats yields long-term potentiation when delivered to the peak of theta and long-term depression when delivered to the trough. *J Neurosci* 23: 11725-11731, 2003.

**Jacobs J, Kahana MJ, Ekstrom AD, Fried I.** Brain oscillations control timing of single-neuron activity in humans. *J Neurosci* 27: 3839-44, 2007.

**Jacobs J, Kahana MJ.** Direct brain recordings fuel advances in cognitive electrophysiology. *Trends Cogn Sci* 14: 162-71, 2010.

**Jahnsen H, Llinas R.** Ionic basis for the electro-responsiveness and oscillatory properties of guinea-pig thalamic neurones in vitro. *J Physiol* 349: 227-247, 1984.

**Jerng HH, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ.** Multiprotein assembly of Kv4.2, KChIP3 and DPP10 produces ternary channel complexes with ISA-like properties. *J Physiol* 568: 767-788, 2005.

**Jerng HH, Lauver AD, Pfaffinger PJ.** DPP10 splice variants are localized in distinct neuronal populations and act to differentially regulate the inactivation properties of Kv4-based ion channels. *Mol Cell Neurosci* 35: 604-624, 2007.

**Jerng HH, Pfaffinger PJ, Covarrubias M.** Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Mol Cell Neurosci* 27: 343-369, 2004a.

**Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ.** Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 87: 2380-2396, 2004b.

**Jin Y, Kim SJ, Kim J, Worley PF, Linden DJ.** Long-term depression of mGluR1 signaling. *Neuron* 55: 277-287, 2007.

**Johnston D, Christie BR, Frick A, Gray R, Hoffman DA, Schexnayder LK, Watanabe S, Yuan LL.** Active dendrites, potassium channels and synaptic plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 667-674, 2003.



**Jung R, Kornmüller AE.** Eine Methodik der ableitung lokalisierter Potentialschwankungen aus subcorticalen Hirngebieten. *Arch Psychiat Nervenkr* 109: 1–30, 1938.

**Kahana MJ, Seelig D, Madsen JR.** Theta returns. *Curr Opin Neurobiol* 11: 739-744, 2001.

**Kameyama K, Lee HK, Bear MF, Huganir RL.** Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression. *Neuron* 21: 1163-1175, 1998.

**Kandel ER, Pittenger C.** The past, the future and the biology of memory storage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 2027-2052, 1999.

**Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM.** *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, 2000, p. xli, 1414 p.

**Kauderer BS, Kandel ER.** Capture of a protein synthesis-dependent component of long-term depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13342-13347, 2000.

**Kim J, Jung SC, Clemens AM, Petralia RS, Hoffman DA.** Regulation of dendritic excitability by activity-dependent trafficking of the A-type K<sup>+</sup> channel subunit Kv4.2 in hippocampal neurons. *Neuron* 54: 933-947, 2007.

**Kim J, Nadal MS, Clemens AM, Baron M, Jung SC, Misumi Y, Rudy B, Hoffman DA.** Kv4 accessory protein DPPX (DPP6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 100: 1835-1847, 2008.

**Kim J, Wei DS, Hoffman DA.** Kv4 potassium channel subunits control action potential repolarization and frequency-dependent broadening in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* 569: 41-57, 2005.

**Kim LA, Furst J, Gutierrez D, Butler MH, Xu S, Goldstein SA, Grigorieff N.** Three-dimensional structure of I(to); Kv4.2-KChIP2 ion channels by electron microscopy at 21 Angstrom resolution. *Neuron* 41: 513-519, 2004.

**Klausberger T.** GABAergic interneurons targeting dendrites of pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampus. *Eur J Neurosci* 30: 947-957, 2009.

**Klausberger T, Magill PJ, Marton LF, Roberts JD, Cobden PM, Buzsaki G, Somogyi P.** Brain-state- and cell-type-specific firing of hippocampal interneurons in vivo. *Nature* 421: 844-848, 2003.

**Klausberger T, Marton LF, Baude A, Roberts JD, Magill PJ, Somogyi P.** Spike timing of dendrite-targeting bistratified cells during hippocampal network oscillations in vivo. *Nat Neurosci* 7: 41-47, 2004.

**Klausberger T, Marton LF, O'Neill J, Huck JH, Dalezios Y, Fuentealba P, Suen WY, Papp E, Kaneko T, Watanabe M, Csicsvari J, Somogyi P.** Complementary roles of cholecystinin- and parvalbumin-expressing GABAergic neurons in hippocampal network oscillations. *J Neurosci* 25: 9782-9793, 2005.

**Klausberger T, Somogyi P.** Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321: 53-57, 2008.

**Klee R, Ficker E, Heinemann U.** Comparison of voltage-dependent potassium currents in rat pyramidal neurons acutely isolated from hippocampal regions CA1 and CA3. *J Neurophysiol* 74: 1982-1995, 1995.

**Klink R, Alonso A.** Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 70: 144-157, 1993.

**Kobertz WR, Williams C, Miller C.** Hanging gondola structure of the T1 domain in a voltage-gated K(+) channel. *Biochemistry* 39: 10347-10352, 2000.

**Kollo M, Holderith NB, Nusser Z.** Novel subcellular distribution pattern of A-type K<sup>+</sup> channels on neuronal surface. *J Neurosci* 26: 2684-2691, 2006.

**Konopacki J.** Theta-like activity in the limbic cortex in vitro. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 311-323, 1998.

**Konopacki J, MacIver MB, Bland BH, Roth SH.** Carbachol-induced EEG 'theta' activity in hippocampal brain slices. *Brain Res* 405: 196-198, 1987.

**Kunkel DD, Lacaille JC, Schwartzkroin PA.** Ultrastructure of stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. *Synapse* 2: 382-394, 1988.

**Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR.** A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of I(to) and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 107: 801-813, 2001.

**Lacaille JC, Schwartzkroin PA.** Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *J Neurosci* 8: 1400-1410, 1988a.

**Lacaille JC, Schwartzkroin PA.** Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J Neurosci* 8: 1411-1424, 1988b.

**Lamsa KP, Heeroma JH, Somogyi P, Rusakov DA, Kullmann DM.** Anti-Hebbian long-term potentiation in the hippocampal feedback inhibitory circuit. *Science* 315: 1262-1266, 2007.

- Lei Z, Deng P, Li Y, Xu ZC.** Downregulation of Kv4.2 channels mediated by NR2B-containing NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 2009.
- Leranth C, and Frotscher M.** Cholinergic innervation of hippocampal GAD- and somatostatin-immunoreactive commissural neurons. *J Comp Neurol* 261: 33-47, 1987.
- Leung LS.** Fast (beta) rhythms in the hippocampus: a review. *Hippocampus* 2: 93-98, 1992.
- Leung LS.** Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 275-290, 1998.
- Leung LW, Yim CY.** Intrinsic membrane potential oscillations in hippocampal neurons in vitro. *Brain Res* 553: 261-274, 1991.
- Li M, Jan YN, Jan LY.** Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel. *Science* 257: 1225-1230, 1992.
- Liang P, Wang H, Chen H, Cui Y, Gu L, Chai J, Wang K.** Structural Insights into KChIP4a Modulation of Kv4.3 Inactivation. *J Biol Chem* 284: 4960-4967, 2009.
- Lien CC, Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Jonas P.** Gating, modulation and subunit composition of voltage-gated K(+) channels in dendritic inhibitory interneurons of rat hippocampus. *J Physiol* 538: 405-419, 2002.
- Lilliehook C, Bozdagi O, Yao J, Gomez-Ramirez M, Zaidi NF, Wasco W, Gandy S, Santucci AC, Haroutunian V, Huntley GW, Buxbaum JD.** Altered Abeta formation and long-term potentiation in a calsenilin knock-out. *J Neurosci* 23: 9097-9106, 2003.
- Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J.** Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* 20: 5715-5724, 2001.
- Locke RE, Nerbonne JM.** Three kinetically distinct  $\text{Ca}^{2+}$ -independent depolarization-activated  $\text{K}^{+}$  currents in callosal-projecting rat visual cortical neurons. *J Neurophysiol* 78: 2309-2320, 1997.
- Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH.** Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 70: 453-511, 1990.
- Lorente de No R.** *Studies on the structure of the cerebral cortex : Continuation of the study of the ammonic system.* Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1934, p. P. [113]-177.
- Lorincz A, Nusser Z.** Cell-type-dependent molecular composition of the axon initial segment. *J Neurosci* 28: 14329-14340, 2008.

**Luthi A, McCormick DA.** Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated upregulation of  $I_h$ . *Neuron* 20: 553-563, 1998.

**Maccaferri G, McBain CJ.** The hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol* 497 ( Pt 1): 119-130, 1996.

**MacVicar BA, Tse FW.** Local neuronal circuitry underlying cholinergic rhythmical slow activity in CA3 area of rat hippocampal slices. *J Physiol* 417: 197-212, 1989.

**Maffie J, Rudy B.** Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type  $\text{K}^+$  currents in neurons. *J Physiol* 586: 5609-5623, 2008.

**Malenka RC, Bear MF.** LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5-21, 2004.

**Malin SA, Nerbonne JM.** Molecular heterogeneity of the voltage-gated fast transient outward  $\text{K}^+$  current,  $I(\text{Af})$ , in mammalian neurons. *J Neurosci* 21: 8004-8014, 2001.

**Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG.** Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649-711, 2000.

**Martina M, Jonas P.** Functional differences in  $\text{Na}^+$  channel gating between fast-spiking interneurons and principal neurons of rat hippocampus. *J Physiol* 505 ( Pt 3): 593-603, 1997.

**Martina M, Schultz JH, Ehmke H, Monyer H, Jonas P.** Functional and molecular differences between voltage-gated  $\text{K}^+$  channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J Neurosci* 18: 8111-8125, 1998.

**McBain CJ, DiChiara TJ, Kauer JA.** Activation of metabotropic glutamate receptors differentially affects two classes of hippocampal interneurons and potentiates excitatory synaptic transmission. *J Neurosci* 14: 4433-4445, 1994.

**McBain CJ, Fisahn A.** Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2: 11-23, 2001.

**Menegola M, Misonou H, Vacher H, Trimmer JS.** Dendritic A-type potassium channel subunit expression in CA1 hippocampal interneurons. *Neuroscience* 154: 953-964, 2008.

**Milner B, Squire LR, Kandel ER.** Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20: 445-468, 1998.

**Mitchell SJ, Rawlins JN, Steward O, Olton DS.** Medial septal area lesions disrupt theta rhythm and cholinergic staining in medial entorhinal cortex and produce impaired radial arm maze behavior in rats. *J Neurosci* 2: 292-302, 1982.

**Morin F, Beaulieu C, Lacaille JC.** Membrane properties and synaptic currents evoked in CA1 interneuron subtypes in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 76: 1-16, 1996.

**Morin F, Haufier D, Skinner FK, Lacaille JC.** Characterization of voltage-gated K<sup>+</sup> currents contributing to subthreshold membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons. *J Neurophysiol*, sous presse.

**Moser EI, Kropff E, Moser MB.** Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31: 69-89, 2008.

**Nadal MS, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Differential characterization of three alternative spliced isoforms of DPPX. *Brain Res* 1094: 1-12, 2006.

**Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B.** The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 37: 449-461, 2003.

**Nerbonne JM, Gerber BR, Norris A, Burkhalter A.** Electrical remodelling maintains firing properties in cortical pyramidal neurons lacking KCND2-encoded A-type K<sup>+</sup> currents. *J Physiol* 586: 1565-1579, 2008.

**Nicoll RA, Malenka RC.** Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377: 115-118, 1995.

**Nunez A, Garcia-Austt E, Buno W, Jr.** Intracellular theta-rhythm generation in identified hippocampal pyramids. *Brain Res* 416: 289-300, 1987.

**Nurse S, Lacaille JC.** Do GABAA and GABAB inhibitory postsynaptic responses originate from distinct interneurons in the hippocampus? *Can J Physiol Pharmacol* 75: 520-525, 1997.

**O'Callaghan DW, Hasdemir B, Leighton M, Burgoyne RD.** Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K<sup>+</sup> channels. *J Cell Sci* 116: 4833-4845, 2003.

**O'Keefe J, Dostrovsky J.** The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34: 171-175, 1971.

**O'Keefe J, Recce ML.** Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3: 317-330, 1993.

**Ogata N, Ohishi Y.** Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Jpn J Pharmacol* 88: 365-377, 2002.

**Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW.** Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K channels. *Biophys J* 69: 2449-2457, 1995.

**Oliet SH, Malenka RC, Nicoll RA.** Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* 18: 969-982, 1997.

**Patel SP, Campbell DL.** Transient outward potassium current, 'I<sub>to</sub>', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569: 7-39, 2005.

**Patel SP, Campbell DL, Strauss HC.** Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 545: 5-11, 2002.

**Perez Y, Morin F, Lacaille JC.** A hebbian form of long-term potentiation dependent on mGluR1a in hippocampal inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9401-9406, 2001.

**Petsche H, Stumpf C, Gogolak G.** [The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells.]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 14: 202-211, 1962.

**Pioletti M, Findeisen F, Hura GL, Minor DL, Jr.** Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer. *Nat Struct Mol Biol* 13: 987-995, 2006.

**Purves D, Roucoux A.** *Neurosciences*. Paris ; Bruxelles: De Boeck Université, 1999, 602 p.

**Purves D, Williams SM.** *Neuroscience*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 2001, 644 p.

**Qi SY, Riviere PJ, Trojnar J, Junien JL, Akinsanya KO.** Cloning and characterization of dipeptidyl peptidase 10, a new member of an emerging subgroup of serine proteases. *Biochem J* 373: 179-189, 2003.

**Raghavachari S, Kahana MJ, Rizzuto DS, Caplan JB, Kirschen MP, Bourgeois B, Madsen JR, Lisman JE.** Gating of human theta oscillations by a working memory task. *J Neurosci* 21: 3175-3183, 2001.

**Ramón y Cajal S.** *Estructura del Asta de Ammon*. Madrid,: 1893, p. P. [53]-114.

**Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC.** Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ Res* 82: 739-750, 1998.

**Rhodes KJ, Carroll KI, Sung MA, Doliveira LC, Monaghan MM, Burke SL, Strassle BW, Buchwalder L, Menegola M, Cao J, An WF, Trimmer JS.** KChIPs and Kv4 alpha subunits as integral components of A-type potassium channels in mammalian brain. *J Neurosci* 24: 7903-7915, 2004.

**Rhodes KJ, Strassle BW, Monaghan MM, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Trimmer JS.** Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K<sup>+</sup> channel complexes. *J Neurosci* 17: 8246-8258, 1997.

**Rivera JF, Ahmad S, Quick MW, Liman ER, Arnold DB.** An evolutionarily conserved dileucine motif in Shal K<sup>+</sup> channels mediates dendritic targeting. *Nat Neurosci* 6: 243-250, 2003.

**Robertson B.** The real life of voltage-gated K<sup>+</sup> channels: more than model behaviour. *Trends Pharmacol Sci* 18: 474-483, 1997.

**Royeck M, Horstmann MT, Remy S, Reitze M, Yaari Y, Beck H.** Role of axonal Nav1.6 sodium channels in action potential initiation of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 100: 2361-2380, 2008.

**Rudy B.** Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* 25: 729-749, 1988.

**Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O.** Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 345: 535-537, 1990.

**Sajikumar S, Frey JU.** Anisomycin inhibits the late maintenance of long-term depression in rat hippocampal slices in vitro. *Neurosci Lett* 338: 147-150, 2003.

**Scannevin RH, Wang K, Jow F, Megules J, Kopsco DC, Edris W, Carroll KC, Lu Q, Xu W, Xu Z, Katz AH, Olland S, Lin L, Taylor M, Stahl M, Malakian K, Somers W, Mosyak L, Bowlby MR, Chanda P, Rhodes KJ.** Two N-terminal domains of Kv4 K(+) channels regulate binding to and modulation by KChIP1. *Neuron* 41: 587-598, 2004.

**Scoville WB, Milner B.** Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 11-21, 1957.

**Serodio P, Rudy B.** Differential expression of Kv4 K<sup>+</sup> channel subunits mediating subthreshold transient K<sup>+</sup> (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol* 79: 1081-1091, 1998.

**Serodio P, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B.** Cloning of a novel component of A-type K<sup>+</sup> channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 75: 2174-2179, 1996.

**Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, Jan LY.** Subcellular segregation of two A-type K<sup>+</sup> channel proteins in rat central neurons. *Neuron* 9: 271-284, 1992.

- Shi H, Wang HZ, Wang Z.** Extracellular Ba(2+) blocks the cardiac transient outward K(+) current. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H295-299, 2000.
- Shibata R, Nakahira K, Shibasaki K, Wakazono Y, Imoto K, Ikenaka K.** A-type K<sup>+</sup> current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells. *J Neurosci* 20: 4145-4155, 2000.
- Sik A, Penttonen M, Ylinen A, Buzsaki G.** Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *J Neurosci* 15: 6651-6665, 1995.
- Singer W.** Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations? *Neuron* 24: 49-65, 111-125, 1999.
- Somogyi P, Klausberger T.** Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562: 9-26, 2005.
- Somogyi P, Nunzi MG, Gorio A, Smith AD.** A new type of specific interneuron in the monkey hippocampus forming synapses exclusively with the axon initial segments of pyramidal cells. *Brain Res* 259: 137-142, 1983.
- Song WJ.** Genes responsible for native depolarization-activated K<sup>+</sup> currents in neurons. *Neurosci Res* 42: 7-14, 2002.
- Song WJ, Tkatch T, Baranauskas G, Ichinohe N, Kitai ST, Surmeier DJ.** Somatodendritic depolarization-activated potassium currents in rat neostriatal cholinergic interneurons are predominantly of the A type and attributable to coexpression of Kv4.2 and Kv4.1 subunits. *J Neurosci* 18: 3124-3137, 1998.
- Squire LR, Alvarez P.** Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol.* 5: 169-177, 1995.
- Squire LR, Zola SM.** Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13515-13522, 1996.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D.** A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37: 173-182, 1991.
- Swartz KJ.** Towards a structural view of gating in potassium channels. *Nat Rev Neurosci* 5: 905-916, 2004.
- Sweatt JD.** Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 99-110, 2004.
- Takimoto K, Yang EK, Conforti L.** Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J Biol Chem* 277: 26904-26911, 2002.



- Vacher H, Mohapatra DP, Trimmer JS.** Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev* 88: 1407-1447, 2008.
- Vanderwolf CH.** Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26: 407-418, 1969.
- Vida I, Halasy K, Szinyei C, Somogyi P, Buhl EH.** Unitary IPSPs evoked by interneurons at the stratum radiatum-stratum lacunosum-moleculare border in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 506 ( Pt 3): 755-773, 1998.
- Vinogradova OS.** Expression, control, and probable functional significance of the neuronal theta-rhythm. *Prog Neurobiol* 45: 523-583, 1995.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J.** Structural basis for modulation of Kv4 K<sup>+</sup> channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 10: 32-39, 2007.
- Whishaw IQ, Vanderwolf CH.** Hippocampal EEG and behavior: changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav Biol* 8: 461-484, 1973.
- Whishaw IQ, Vanderwolf CH.** Hippocampal EEG and behavior: effects of variation in body temperature and relation of EEG to vibrissae movement, swimming and shivering. *Physiol Behav* 6: 391-397, 1971.
- Whittington MA, Traub RD.** Interneuron diversity series: inhibitory interneurons and network oscillations in vitro. *Trends Neurosci* 26: 676-682, 2003.
- Williams S, Samulack DD, Beaulieu C, LaCaille JC.** Membrane properties and synaptic responses of interneurons located near the stratum lacunosum-moleculare/radiatum border of area CA1 in whole-cell recordings from rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 71: 2217-2235, 1994.
- Wilson MA, McNaughton BL.** Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* 265: 676-679, 1994.
- Winson J.** Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 201: 160-163, 1978.
- Witter MP, Naber PA, van Haften T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, Scheltens P, Lopes da Silva FH.** Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10: 398-410, 2000.
- Yu FH, Yarov-Yarovoy V, Gutman GA, Catterall WA.** Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev* 57: 387-395, 2005.

**Yu SP, Kerchner GA.** Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 52: 612-617, 1998.

**Yuan W, Burkhalter A, Nerbonne JM.** Functional role of the fast transient outward K<sup>+</sup> current I<sub>A</sub> in pyramidal neurons in (rat) primary visual cortex. *J Neurosci* 25: 9185-9194, 2005.

**Zagha E, Ozaita A, Chang SY, Nadal MS, Lin U, Saganich MJ, McCormack T, Akinsanya KO, Qi SY, Rudy B.** DPP10 modulates Kv4-mediated A-type potassium channels. *J Biol Chem* 280: 18853-18861, 2005.

**Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW.** Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 372: 97-100, 1994.

**Zhang L, McBain CJ.** Potassium conductances underlying repolarization and after-hyperpolarization in rat CA1 hippocampal interneurons. *J Physiol* 488 ( Pt 3): 661-672, 1995a.

**Zhang L, McBain CJ.** Voltage-gated potassium currents in *stratum oriens-alveus* inhibitory neurones of the rat CA1 hippocampus. *J Physiol* 488 ( Pt 3): 647-660, 1995b.

**Zhou W, Qian Y, Kunjilwar K, Pfaffinger PJ, Choe S.** Structural insights into the functional interaction of KChIP1 with Shal-type K(+) channels. *Neuron* 41: 573-586, 2004.

**Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG.** Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 6: 2950-2967, 1986.

**Zsiros V, Maccaferri G.** Electrical coupling between interneurons with different excitable properties in the stratum lacunosum-moleculare of the juvenile CA1 rat hippocampus. *J Neurosci* 25: 8686-8695, 2005.